

# ANNALES

## DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

**E. DUCLAUX**

---

COMITÉ DE RÉDACTION

**D<sup>r</sup> CALMETTE**, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;  
**D<sup>r</sup> L. MARTIN**, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;  
**D<sup>r</sup> ROUX**, directeur de l'Institut Pasteur ;  
**D<sup>r</sup> VAILLARD**, membre de l'Académie de Médecine.

---

TOME CINQUANTE ET UNIÈME

Juillet-décembre 1933

---

PARIS

**MASSON ET C<sup>ie</sup>**, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6<sup>e</sup>).

QR

1

A475

v.51

July-Dec.

1933

PER

---

PARIS. — A. MARETHEUX ET L. PACTAT, IMP., 4, RUE CASSETTE. — 1933.

---

# ANNALES

## DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

### L'INSTITUT PASTEUR DU MAROC A CASABLANCA

par le Dr EDM. SERGENT.

Fidèle à la pensée du Maître, qui demande « que l'on multiplie les laboratoires pour que l'humanité grandisse, se fortifie et devienne meilleure », l'Institut Pasteur répond en 1911 à l'appel du ministre des Affaires étrangères et fonde, avec l'aide financière du Gouvernement, une filiale à Tanger, porte du Maroc. Sous la direction du Dr P. Remlinger, le nouvel Institut acquiert rapidement et accroît chaque année, malgré la modicité de ses ressources, un renom justifié de science et de bienfaisance.

Lorsque le protectorat français est établi au Maroc, Th. Monod a le mérite de faire créer par le général Lyautey, en 1912, un laboratoire de microbie vétérinaire, que dirige après lui F. Velu. Puis le Service de Santé militaire organise, en 1915, à Rabat, un service de vaccination antivariolique et de vaccination antirabique que le Dr Hornus assure avec dévouement, avec des moyens précaires, jusqu'en 1932. Il faut encore citer, comme œuvre des laboratoires, le Service antipaludique créé en 1919, suivant le programme demandé au Dr Edmond Sargent par le général Lyautey et confié au Dr Ch. Vialatte, ainsi que les recherches scientifiques que le Dr P. Delanoë poursuit à Mazagan, tout en s'acquittant d'un service médical chargé.



Lorsque la convention de Fez place, en 1912, l'Empire chérifien sous le protectorat français, à l'exception de la partie septentrionale réservée à l'Espagne, il devient évident que l'Institut Pasteur de Tanger, séparé du Maroc français par la zone internationale et la zone espagnole, doit être doublé d'un autre Institut Pasteur, placé près des Services de la Résidence générale. Le D<sup>r</sup> P. Remlinger procède à une première étude de la question. En décembre 1928, le D<sup>r</sup> Roux, d'accord avec le Résident général Steeg, envoie à Rabat le D<sup>r</sup> Emond Sergent, Directeur de l'Institut Pasteur d'Algérie, avec mission de tracer le programme du futur établissement, de rédiger le contrat à passer entre le Gouvernement chérifien et l'Institut Pasteur, d'organiser le nouvel Institut, d'en établir les plans et d'en surveiller la construction. Cette mission dure trois ans. Elle est facilitée par le bon accueil du Résident général Lucien Saint, de la Direction de l'Hygiène et de la Santé publique, de la Direction de l'Agriculture, de l'Institut scientifique chérifien, de toutes les hautes Administrations marocaines, de la Municipalité de Casablanca et par l'aide du vétérinaire colonel Th. Monod.

Elle aboutit à l'élaboration d'un contrat qui définit l'Institut Pasteur du Maroc comme « un centre de recherches scientifiques d'après les méthodes pastoriennes, entièrement placé sous la direction scientifique, technique et administrative de l'Institut Pasteur de Paris ». Cet Institut a pour objet :

1<sup>o</sup> L'étude des maladies virulentes et parasitaires de l'homme, des animaux et des plantes, en particulier de celles qui intéressent le Maroc;

2<sup>o</sup> L'enseignement supérieur des méthodes microbiologiques et parasitologiques appliquées à la médecine humaine, à la médecine vétérinaire et à l'agriculture;

3<sup>o</sup> D'assurer le fonctionnement des services pratiques nécessaires aux services publics d'hygiène et d'assistance médicale, aux services vétérinaires sanitaires et aux services agricoles du Maroc (analyses microbiologiques, délivrance des sérums et vaccins préparés par l'Institut Pasteur de Paris, traitement de la rage après morsure).

Le 1<sup>er</sup> janvier 1932, l'Institut Pasteur du Maroc à Casablanca est organisé et construit et le D<sup>r</sup> G. Blanc, Directeur de l'Institut Pasteur hellénique, en est nommé Directeur.



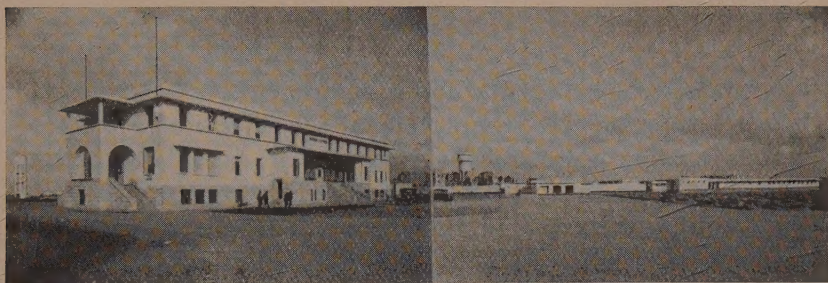


FIG. 1. — Vue générale. A gauche : Bâtiment principal. A droite : Ecuries des animaux. En face : Garages et logements des indigènes. A l'arrière-plan : Hôpital militaire.

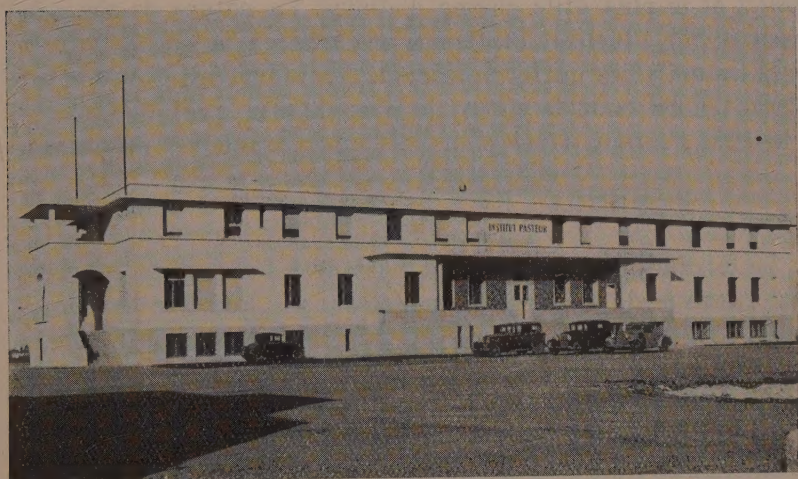


FIG. 2. — Le bâtiment principal.

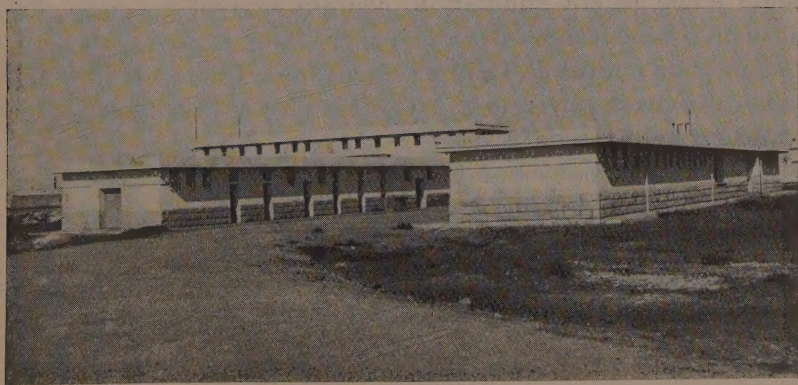


FIG. 3. — A gauche : Bâtiment des animaux neufs.  
A droite : Bâtiment des animaux inoculés.



La première question que doit résoudre, en 1928, le D<sup>r</sup> Edm. Sergent est celle de l'emplacement de l'Institut Pasteur ; l'Administration propose deux villes : Rabat, capitale administrative, ou Casablanca, capitale économique. A Rabat, l'Institut serait près des chefs de l'Administration et des centres intellectuels, tels que l'École des Hautes Études marocaines. Mais c'est à Casablanca, grand port et tête de ligne ferroviaire, dont la population est déjà le double de celle de Rabat et croît sans cesse, que la pathologie humaine, la pathologie vétérinaire, la microbie agricole et la microbie industrielle offrent le plus grand et le plus utile champ d'études. La nature de ses travaux oblige l'Institut Pasteur à se mêler à la vie, à voir de près les maladies qui la menacent, les industries qui la nourrissent. C'est là où la vie est le plus intense qu'il faut placer l'Institut Pasteur. C'est pour cela que Casablanca est choisi.

\*  
\* \*

Le terrain affecté à l'Institut Pasteur à Casablanca est situé sur l'avenue du Général-d'Amade, dans le quartier des Hôpitaux. Il n'est séparé que par un mur de l'Hôpital militaire et par une rue de l'Hôpital civil. Le voisinage de ces Hôpitaux est propice au travail en collaboration.

La superficie du terrain dépasse 4 hectares ; il a la forme d'un trapèze irrégulier allongé dans la direction nord-sud. Ses côtés mesurent : à l'ouest 380 mètres, au nord 94 mètres, à l'est 327 mètres, au sud 165 mètres. Le terrain occupe la partie haute d'une légère ondulation, courant de l'est à l'ouest, de sorte qu'il bénéficie de la brise de mer. Dans sa partie sud, un ancien puits fournit de l'eau en abondance. Un réservoir a été construit dans sa partie nord, à 18 mètres au-dessus du sol, pour emmagasiner l'eau de la ville.

Les constructions dont le plan a été établi avec soin par M. Bousquet, architecte du Gouvernement, comprennent un établissement principal pour les laboratoires et des dépendances pour les animaux et les services. Toutes les constructions ont été établies de façon à permettre plus tard l'édifica-

tion de nouveaux laboratoires ou de nouvelles dépendances sans se gêner mutuellement.

Le bâtiment principal est situé à la partie médiane du tra-

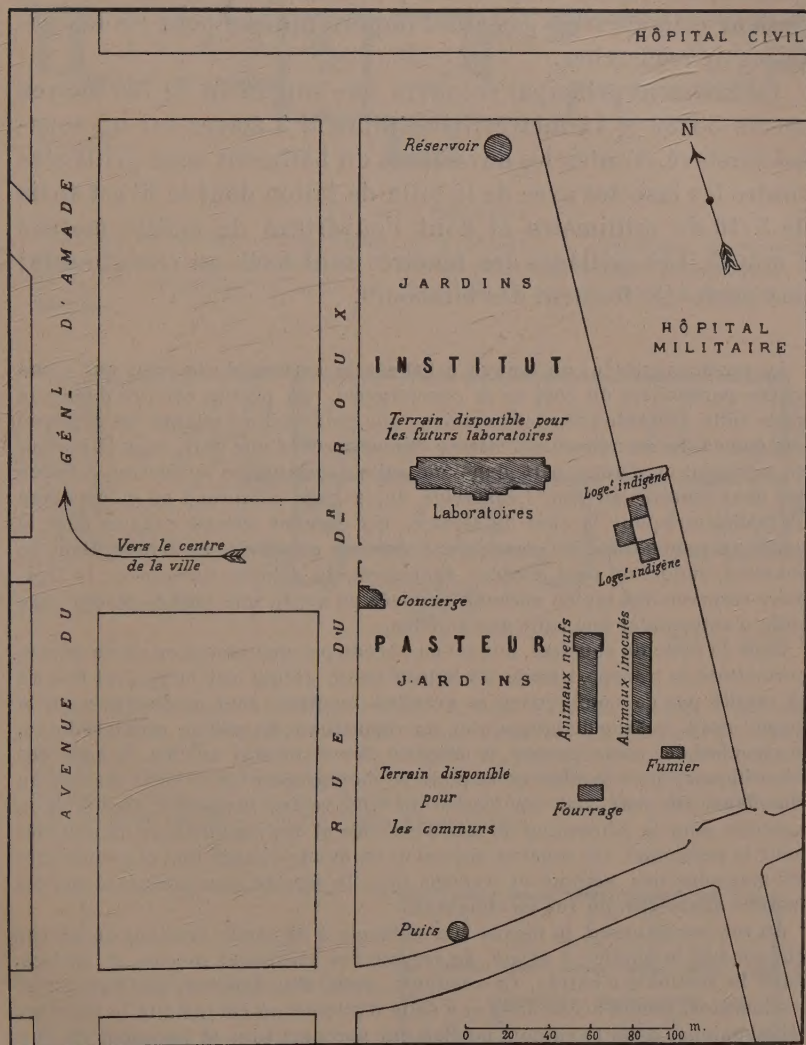


FIG. 4. — Plan général de l'Institut Pasteur.

pèze, perpendiculaire à son grand axe, de façon que les fenêtres des laboratoires soient toutes exposées au nord, orientation



qui facilite le travail pendant la saison chaude et assure un bon éclairage. On a placé sur la façade sud : la bibliothèque, le service des sérums et vaccins, les laveries et salles de stérilisation, etc., pour lesquels la question de l'éclairage et de la chaleur estivale n'est pas aussi importante que pour les laboratoires de recherches.

Le bâtiment principal recouvre une superficie de 750 mètres carrés ( $53^m50 \times 14$  mètres). Il comprend 2 étages sur un sous-sol surélevé. Toutes les ouvertures du bâtiment sont grillagées contre les insectes avec de la toile de laiton dont le fil est épais de  $\frac{5}{10}$  de millimètre et dont l'ouverture de maille mesure 1 mm. 5. Les grillages des fenêtres sont fixés au chambranle ; aux portes ils forment des tambours.

Au rez-de-chaussée, on trouve à l'ouest le service de la rage qui a une entrée particulière du côté de la conciergerie. Un perron conduit dans une vaste salle d'attente pour les hommes ; une petite salle d'attente est réservée aux dames. La grande salle d'attente donne accès, d'une part, dans le bureau du médecin, et, d'autre part, dans une salle d'inoculation spacieuse, éclairée par deux fenêtres au sud. Le service de la rage comprend au même étage un laboratoire pour le chef de service. Un escalier spécial conduit dans la partie du sous-sol qui est strictement réservée au service de la rage. Dans ce sous-sol, auquel on peut accéder également du dehors, on trouve : la lapinière réservée aux lapins enragés (exposée au nord), une grande laverie, une salle d'autopsie et une salle des moelles.

Dans le reste du sous-sol, auquel on accède par une rampe en pente douce, permettant le transport facile de lourds colis, et qui est largement éclairé et ventilé par de nombreuses et grandes fenêtres, sont aménagés : sur la façade nord, la salle de broyage et de répartition du vaccin antivariolique, la chambre des centrifugeurs, le magasin des sérums et vaccins, la salle des frigorifiques, une chambre noire pour la photographie et le local réservé au chauffage. Du côté sud, on trouve de très vastes magasins, l'installation spéciale pour la fabrication du gaz d'essence et des installations de douches pour le personnel. Un escalier spécial et un monte-charge font communiquer les magasins des sérums et vaccins avec le service correspondant qui est installé au-dessus, au rez-de-chaussée.

Au rez-de-chaussée, la façade sud présente à sa partie médiane un perron qui conduit le public : à droite, au service des sérums et vaccins, et, en face, dans le vestibule d'entrée. Ce vestibule, muni d'un tambour grillagé contre les insectes, donne accès dans une salle d'attente où est installé le standard téléphonique, dans le couloir médian qui parcourt tout le bâtiment de l'est à l'ouest, dans la salle des sérums et vaccins et, enfin, aux escaliers du premier étage et du sous-sol. Sur le couloir médian, on trouve, au nord, le laboratoire et le cabinet du directeur, le secrétariat, le laboratoire et le cabinet du chef du service vétérinaire, un laboratoire de chimie, un laboratoire de physique, un grand laboratoire de chimie et des fermentations. Du côté sud du couloir, sont situés : un très grand laboratoire général pour les stérili-



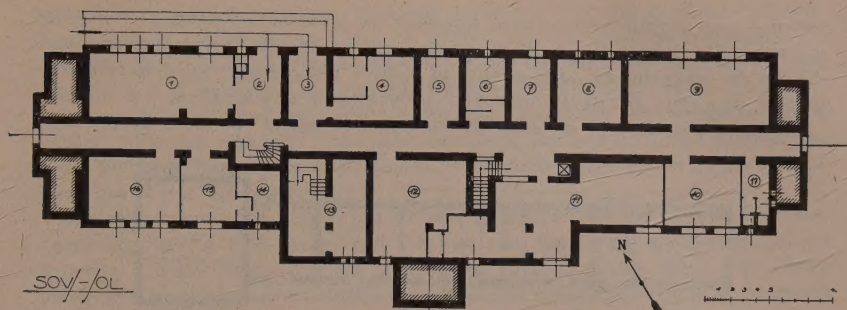


FIG. 5. — Sous-sol.

Service de la rage : 1, lapinière; 2, 3, entrées; 4, chauffage; 5, centrifugeurs; 6, salle de photographie; 7, vaccin antivariolique; 8, frigorifiques; 9, 10, 11, 12, magasins; 14, salle des moelles; 15, laboratoire; 16, laverie; 17, douches.

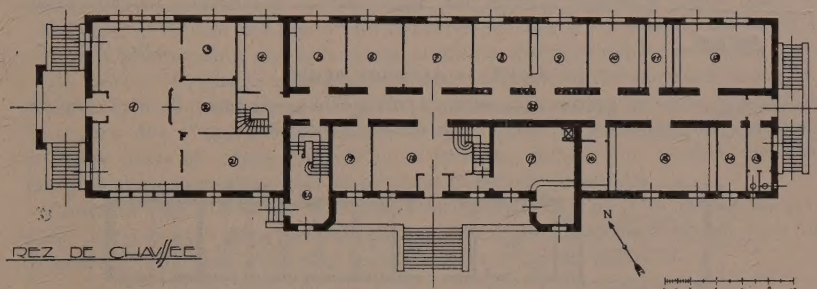


FIG. 6. — Rez-de-chaussée.

Service de la rage : 1, salle d'attente; 2, salle d'attente dames; 3, bureau; 4, laboratoire; 5, laboratoire du directeur; 6, cabinet du directeur; 7, secrétariat; 8, 9, service vétérinaire; 10, chimie; 11, physique; 12, fermentation et chimie; 13, lavabos; 14, vestiaire dames; 15, stérilisation; 16, étuves; 17, service des sérums et vaccins; 18, vestibule d'entrée; 19, dactylographes; 20, appartement du directeur; 21, salle d'inoculation.

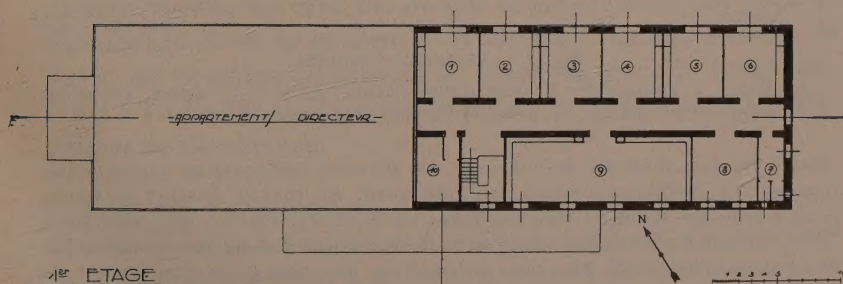


FIG. 7. — Premier étage.

1, 2, 3, 4, 5, 6, laboratoires; 7, lavabos; 8, laverie; 9, bibliothèque; 10, étuves.

sations, une chambre-étuve avec tambour, le service des sérums et vaccins qui est relié, comme il est dit plus haut, par un escalier privé et un monte-charge au magasin du sous-sol et qui s'ouvre directement au dehors sur le perron, une salle des dactylographes, un vestiaire, des lavabos.

Du vestibule d'entrée un escalier conduit à la partie orientale du premier

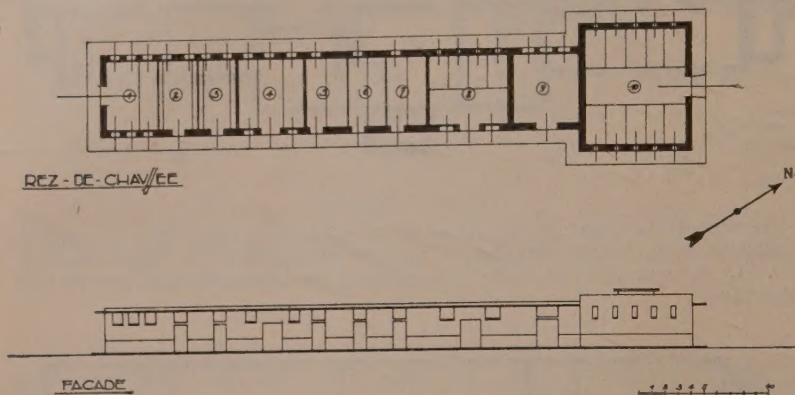


FIG. 8. — Animaux neufs.

1, singes; 2, 3, petits rongeurs; 4, bergerie-porcherie; 5, 6, 7, lapins, cobayes; 8, génisserie; 9, atelier; 10, écurie-bouverie.

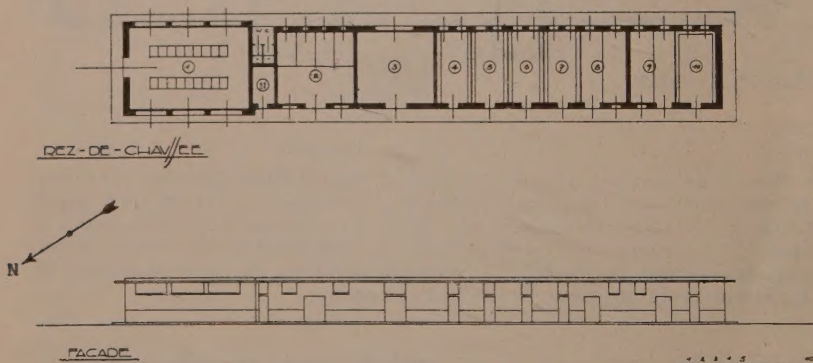


FIG. 9. — Animaux inoculés.

1, chenil; 2, génisserie; 3, salle d'inoculation; 4, 5, 6, 7, lapins, cobayes; 8, 9, bergerie-porcherie; 10, petits rongeurs; 11, magasin.

étage, qui, comme le rez-de-chaussée, est traversé sur toute sa longueur par un couloir médian est-ouest. Du côté nord, ce couloir dessert 6 laboratoires dont les fenêtres sont exposées au nord, et, du côté sud, une vaste bibliothèque, une chambre-étuve avec tambour, une laverie, des lavabos, etc. La partie occidentale du premier étage est occupée par l'appartement du directeur, dont l'entrée privée s'ouvre sur la façade au rez-de-chaussée.

Les dépendances comprennent : le logement du concierge sur l'avenue du



Général-d'Amade (à l'ouest), un garage pour 3 autos, une buanderie et deux logements de 2 pièces, avec cour et jardin, pour les garçons indigènes. Un hangar à fourrage et une fosse à fumier à l'abri des mouches sont placés près d'un portail de service dans une rue transversale située au sud.

Les écuries comprennent deux bâtiments, l'un pour les animaux neufs, l'autre pour les animaux inoculés. Ces deux bâtiments, de 46 mètres sur 6 m. 50, sont disposés parallèlement, à 38 mètres environ l'un de l'autre. Leur grand axe est nord-sud.

Une écurie-bouverie peut loger 10 gros animaux dans des stalles. Une sin-gerie installée à l'extrémité sud de l'un des bâtiments reçoit les rayons solaires à toute heure du jour. Un chenil avec 18 cages a ses ouvertures masquées de la vue pour assurer la tranquillité des chiens. Dans le bâtiment des animaux neufs, une génissierie à 4 stalles permet la mise en observation des génisses destinées au vaccin antivariolique. En face, dans le bâtiment des animaux inoculés, se trouve une génissierie semblable, à côté d'une salle d'opération, aux murs recouverts de faïence, pour l'inoculation du vaccin et sa récolte.

Dans le bâtiment des animaux neufs, les trois lapinières destinées aux lapins et cobayes neufs (répartis dans 15 compartiments) sont séparées des deux pièces consacrées à l'élevage des petits rongeurs (rats, souris, mériones, gerbilles, etc.) par une bergerie-porcherie à 8 stalles, de façon à éviter la propagation des épizooties parmi les diverses espèces de rongeurs.

De même, et pour la même raison, dans le bâtiment des animaux inoculés, deux bergeries-porcheries, à 4 stalles chacune, séparent la pièce des petits rongeurs des 4 lapinières réservées aux lapins et cobayes, où peuvent prendre place 96 cages amovibles en treillage métallique, posées sur des tringles au-dessus d'un large et profond fossé d'écoulement.

Chacune des pièces est pourvue d'un poste d'eau pour le lavage au jet. Leur aération est bien assurée. Un atelier et un magasin à vivres pour la préparation des aliments sont installés sous le même toit.

Les écuries, comme le bâtiment principal, sont disposées de telle façon que d'autres constructions ayant la même destination pourront, dans l'avenir, être élevées à leurs côtés, quand l'exigeront les nécessités grandissantes des laboratoires.

Il est très utile, pour un Institut Pasteur, de disposer d'une annexe rurale, servant de station expérimentale. La ville de Casablanca a eu la générosité d'offrir à l'Institut Pasteur de Paris un domaine de plus de 27 hectares, dont 10 irrigables, situé à Tit Mellil, sur la route de Mediouna à Fedalah, à 15 kilomètres de Casablanca.

Telle est l'organisation de la nouvelle filiale pastorienne, conçue de façon à pouvoir se développer à mesure que croîtront les besoins du pays et à collaborer ainsi à l'essor magnifique du Maroc.

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACTION DU STAPHYLOCOQUE SUR LE PLASMA OXALATÉ ET SUR LE FIBRINOGENÈ

par le Dr O. GENGOU.

*(Laboratoire d'hygiène de l'Université de Bruxelles.)*

Différents auteurs, Much [1], Kleinschmidt [2], Gonzenbach [3], Delrez et Govaerts [4], Gratia [9], ont relaté la propriété que possèdent de nombreuses souches staphylococciques de coaguler le plasma oxalaté.

Nolf d'une part, Gratia de l'autre, se sont efforcés d'élucider le mécanisme de ce phénomène.

Ainsi que Nolf [5] l'a montré, le staphylocoque, qui provoque la coagulation du plasma oxalaté, ne coagule pas par contre les solutions pures de fibrinogène.

Cet auteur a conclu de là que la coagulation du plasma par le staphylocoque nécessite la participation de certains des éléments, qui, dans la coagulation spontanée du sang, concourent à la formation de la thrombine.

Il pense que, en outre, les corps microbiens staphylococciques, comme d'autres germes du reste, favorisent la coagulation du plasma oxalaté par un processus identique à celui que mettent en œuvre les substances dites thromboplastiques d'Al. Schmidt.

Gratia [10] a constaté que cette action thromboplastique du corps microbien ne constitue pas l'élément essentiel du mécanisme de la coagulation du plasma oxalaté par le staphylocoque.

Il se sépare du reste plus complètement encore des conceptions de Nolf. Pour lui, la coagulation du plasma oxalaté par le staphylocoque ne réclame pas la participation de l'un ou de plusieurs des éléments constitutifs de la thrombine. Utilisant du plasma non seulement oxalaté, mais aussi filtré sur bougie (qui retient le cytozème) [Bordet] et épuisé de prosé-



rozyme par mélange à une petite quantité de phosphate tricalcique (Bordet), il constate que ce plasma, privé de tous les éléments constitutifs de la thrombine, est parfaitement coagulé par le staphylocoque.

Aussi pense-t-il que si ce germe ne provoque pas, ainsi que Nolf l'a vu, la coagulation d'une solution pure de fibrinogène, c'est parce que, faute d'éléments nutritifs en quantité suffisante dans cette solution, le développement microbien y est trop faible. Il croit démontrer qu'il en est bien ainsi, en provoquant la coagulation par le staphylocoque d'une solution pure de fibrinogène, additionnée d'une certaine quantité de plasma oxalaté, filtré et phosphaté, dont il a en outre extrait le fibrinogène.

Ainsi que Nolf l'a fait observer [7], cette démonstration n'est pas suffisante; elle l'eût été, nous dit cet auteur, si, au lieu d'enrichir en matières nutritives une solution pure de fibrinogène par l'addition de plasma oxalaté, filtré, phosphaté et dépouillé de fibrinogène, on avait obtenu la coagulation grâce à une simple addition de bouillon. On ne peut, en effet, tout au moins dans des recherches sur la coagulation, admettre *a priori* que le plasma oxalaté, même après filtration sur bougie, épuisement par le phosphate tricalcique et extraction du fibrinogène, ne contienne plus aucune matière susceptible de jouer un rôle dans la coagulation et puisse conséquemment être considéré simplement comme un apport de matières nutritives.

\*  
\* \*

Gonzenbach [3] a constaté, d'autre part, que la coagulation du plasma oxalaté par le staphylocoque est suivie, après un certain temps, de la dissolution du caillot. Cette thrombolyse — ou fibrinolyse — est plus ou moins rapide, comme la coagulation du reste, suivant l'espèce animale dont provient le plasma.

Gratia [41] a même fait observer « qu'il semble exister un certain parallélisme entre l'action coagulante et l'action fibrinolytique du staphylocoque, étant donné que ce sont les plasmas qui se coagulent le plus rapidement, dont les caillots se fibrinolysent le plus vite ».... « Il y a là un phénomène fort

comparable à l'action coagulante, puis protéolytique, que le ferment labique exerce sur le lait »:

En réalité, les expériences mettant en œuvre le staphylocoque lui-même et où la multiplication microbienne est la condition obligatoire de la coagulation du plasma, puis de la fibrinolyse du caillot, ne permettent guère de déterminer si ces deux phénomènes sont dus à un même facteur ou à deux agents, produits successivement par le germe microbien suivant l'état des matériaux nutritifs au sein desquels il prolifère. Nous verrons par les expériences relatées plus loin, où est exclue l'intervention du microbe vivant, que l'hypothèse de Gratia paraît confirmée par les faits.

#### APPARITION DU POUVOIR COAGULANT DANS LES CULTURES STAPHYLOCOCCIQUES NE CONTENANT PAS DE FIBRINOGENÈ.

Si le mécanisme de la dissolution des caillots fibrineux par le staphylocoque reste difficile à élucider aussi longtemps qu'on est obligé de recourir pour la provoquer à des mélanges où le germe microbien se trouve à l'état vivant, il en est de même du processus de la coagulation par le staphylocoque des plasmas rendus artificiellement incoagulables.

Aussi nous paraît-il intéressant de relater les recherches qui nous ont permis d'observer l'apparition des propriétés coagulante et fibrinolytique dans des cultures de staphylocoque faites dans des milieux privés de fibrinogène, et de provoquer ensuite la coagulation des plasmas incoagulables ainsi que la lyse des caillots par l'emploi de ces cultures après les avoir débarrassées de tout germe vivant (1).

Nous allons envisager tout d'abord l'apparition de la propriété coagulante. Nous userons dans ce mémoire, pour simplifier le langage, du terme de « staphylocoagulase » proposé par Gratia.

Nous avons obtenu la staphylocoagulase dans divers milieux,

(1) Dans une note déjà ancienne, Gratia [12] a signalé la possibilité d'obtenir, par filtration de cultures staphylococciques en bouillon *préalalement lysées par le bactériophage*, des liquides privés de germes vivants, susceptibles de coaguler les plasmas oxalatés. Cette observation laisse supposer que l'apparition de cette propriété dans le liquide de culture réclame la lyse préalable du microbe par le bactériophage.



même les plus simples. Nous avons tout d'abord employé le plasma oxalaté, débarrassé de son fibrinogène par chauffage à 58-60° pendant trente minutes, suivi d'une centrifugation énergique éloignant le fibrinogène coagulé ; nous avons utilisé de même le sérum obtenu par recalcification du plasma oxalaté, le sérum étant à nouveau oxalaté à 1 p. 1.000 après défibrination, puis chauffé à 58-60°. Nous avons pu, à cet égard, recourir soit au plasma de lapin, soit au plasma de cobaye.

Mais nous avons obtenu le même résultat en utilisant simplement du bouillon, voire de l'eau-peptonée ou une simple macération de viande, ces liquides ayant un  $pH = 7,6$  et étant oxalatés à 1 p. 1.000. Il est cependant indispensable, pour l'emploi de ces derniers milieux, de les ensemençer d'une souche staphylococcique repiquée quotidiennement, et entretenue de la sorte dans un excellent état de vitalité.

EXPÉRIENCE 1. — Ensemençons d'une même dose de germes staphylococciques deux tubes contenant respectivement une quantité déterminée de plasma oxalaté de lapin (tube A), et une quantité identique du même plasma préalablement débarrassé de fibrinogène par chauffage à 58°-60° et centrifugation (tube B). Après quelques heures de séjour à 37°, le tube A se coagule. Préparons, en outre, un troisième tube (tube C) constitué comme le tube B, mais non ensemençé.

Centrifugeons énergiquement à *ce moment* le tube B, et portons le liquide, ainsi presque débarrassé de germes, pendant trente minutes à 60°, en même temps que le tube C.

Assurons-nous par un ensemençement en bouillon que le chauffage du tube B en a détruit tous les germes qui ont résisté à la centrifugation. Introduisons ensuite dans deux séries de tubes une même quantité de plasma oxalaté. Dans l'une des séries, ajoutons des doses décroissantes de liquide B ; dans l'autre, des doses identiques de liquide C.

Le tout étant placé à 37°, on constate le lendemain qu'aucun des tubes de la seconde série n'est coagulé, tandis que le sont tous ceux de la première, contenant une quantité de liquide B au moins égale à 1/4-1/16° (suivant les expériences) de la dose de plasma oxalaté.

Il en est de même si le liquide B est mélangé à du plasma oxalaté de cobaye.

Dans le plasma oxalaté, débarrassé au préalable de fibrinogène ainsi qu'il a été dit plus haut, et ensemençé de staphylocoques, on constate donc le développement de la staphylocoagulase, au moment même où, dans un tube témoin, une dose identique de staphylocoques provoque la coagulation d'une même quantité de plasma oxalaté de lapin.

Cette propriété des cultures débarrassées des germes n'est

pas due à un autre facteur, tel qu'une modification du  $pH$ , ou à une influence, comparable à une action thromboplastique, des germes ayant persisté dans le liquide malgré la centrifugation et tués ensuite par un chauffage à  $60^{\circ}$ .

EXPÉRIENCE 2. — Sous l'influence de la prolifération microbienne, le  $pH$  du milieu, alcalin tout d'abord, devient acide. Cette modification du  $pH$  est cependant étrangère au pouvoir coagulant des cultures. En effet, ce pouvoir reste intact malgré l'alcalinisation ultérieure des milieux.

De même, l'acidification du plasma oxalaté n'y détermine aucune coagulation.

EXPÉRIENCE 3. — D'autre part, la coagulation du plasma oxalaté par les cultures de staphylocoques centrifugées, puis chauffées à  $60^{\circ}$ , n'est pas due à une action des germes qui y ont persisté.

Reprenons le sédiment microbien obtenu par la centrifugation de ces cultures; délayons-en une partie dans du plasma oxalaté débarrassé de fibrinogène (voir plus haut), de manière à obtenir une émulsion microbienne un peu plus riche que les cultures centrifugées. Chauffons ensuite cette émulsion à  $60^{\circ}$  pendant trente minutes.

La stérilité en étant vérifiée, faisons agir sur la même quantité de plasma oxalaté que dans l'expérience 1 des quantités décroissantes de cette émulsion. Tous les tubes remis à  $37^{\circ}$  restent indéfiniment liquides.

EXPÉRIENCE 4. — La production de coagulase dans les cultures de staphylocoques en milieu liquide, déjà susceptible d'être mise en évidence dès que la culture a quelques heures, s'accroît encore quelque peu dans la suite, sans toutefois s'accroître proportionnellement à la durée de la culture. Par contre, une fois produite, la staphylocoagulase persiste dans le milieu, sans paraître s'affaiblir.

#### PROPRIÉTÉS DE LA STAPHYLOCOAGULASE.

Ainsi qu'on l'a vu plus haut, nous avons eu recours, dans la préparation de la staphylocoagulase aux dépens de cultures centrifugées, au chauffage de ces cultures à  $60^{\circ}$  pendant trente minutes, afin de tuer les germes restés en suspension. Cette méthode est, en effet, beaucoup supérieure à la filtration des cultures sur bougie Chamberland ou sur filtre Seitz.

Tandis que la staphylotoxine traverse aisément ces filtres, ceux-ci retiennent en totalité ou en partie la staphylocoagulase. L'adsorption est d'autant plus complète que la culture filtrée est moins riche en matières protéiques coagulables par la chaleur. Des cultures staphylococciques en bouillon, centrifugées, puis chauffées à  $60^{\circ}$  et trouvées riches en coagulase, se montrent



pratiquement privées de toute propriété coagulante, si elles sont filtrées, chauffées ou non, sur bougie Chamberland ou sur filtre Seitz. Au contraire, des cultures staphylococciques en plasma oxalaté et privé de fibrinogène, traitées de même, ne perdent qu'une partie de leur pouvoir coagulant. Il est vraisemblable que ces différences dans l'influence de la filtration suivant les milieux de culture résultent de ce que le pouvoir d'adsorption de la matière des filtres est partiellement saturé par des substances protéiques thermocoagulables du plasma oxalaté, quand la culture filtrée a été obtenue dans ce milieu, tandis qu'il n'a, pour se satisfaire, lors de la filtration des cultures en bouillon, que des produits microbiens tels que la coagulase.

Celle-ci est, du reste, également adsorbée avec facilité par le papier-filtre, moins par le collodion, moins encore par le celophane.

C'est probablement la facilité avec laquelle les filtres retiennent la coagulase qu'est due la circonstance que, jusqu'ici, on ne paraît pas avoir réussi à mettre sa présence en évidence dans les cultures staphylococciques, en l'absence de germe vivant.

Ainsi que nous l'avons signalé dans les expériences relatives à l'obtention de la coagulase, celle-ci résiste au chauffage à 60° pendant trente minutes, alors que cette température tue le germe lui-même. En réalité, la thermostabilité en est variable, dépendant de la constitution du milieu de culture où cette substance a été produite.

Faisons des cultures staphylococciques soit dans du plasma oxalaté de lapin privé au préalable de fibrinogène par chauffage à 60°, soit dans du sérum réoxalaté, livré par un plasma que l'addition de calcium a fait coaguler.

Portons-les pendant trente minutes, après centrifugation, à des températures allant de 60 à 75°. Elles restent liquides jusqu'à 65°, tandis qu'elles commencent à se coaguler à 70° et le sont complètement à 75°. Or, même chauffés à 65°, ces milieux sont encore doués d'un pouvoir coagulant normal vis-à-vis du plasma oxalaté.

La thermostabilité de la coagulase est beaucoup plus grande quand elle a été obtenue par culture staphylococcique en

bouillon oxalaté. Dans ce cas, même un chauffage à 100° pendant quinze minutes la laisse intacte.

De même, elle garde son pouvoir très longtemps, peut-être beaucoup plus longtemps que nous n'avons pu l'observer — plusieurs mois —, quand elle est conservée à froid.

Par contre, la staphylocoagulase ne dialyse pas à travers le collodion, ainsi que Van Brusseghe [13] l'avait déjà observé en cultivant le staphylocoque dans du plasma oxalaté contenu dans un sac de collodion, celui-ci plongeant lui-même dans une certaine quantité de plasma oxalaté non ensemencé. On peut prolonger pendant plusieurs semaines la dialyse en présence d'un courant continu d'eau physiologique oxalatée à 1 p. 1.000, sans que le pouvoir coagulant du liquide soit affaibli, que la culture ait été faite en bouillon ou en plasma oxalaté privé de fibrinogène.

Après avoir ainsi été soumise à une dialyse prolongée, la coagulase peut être desséchée complètement, sans rien perdre de son action, quelle que soit la durée de son maintien à l'état sec.

Nous avons recherché, en outre — en vue de l'obtention d'un second mode pratique de préparation de la coagulase —, si elle supporte l'action des antiseptiques. Additionnée d'acide phénique à 1,5 p. 1.000, de permanganate de potassium à 1 p. 1.000, de tryptaflavine à 1 p. 1.000 et laissée sous l'influence de ces produits pendant vingt-quatre heures, la coagulase conserve son pouvoir. Mais, seule la tryptaflavine, à la dose indiquée ci-dessus, convient pour l'obtention de la coagulase aux dépens d'une culture staphylococcique non chauffée à 60°, lorsque cette culture a été faite dans du plasma oxalaté dépouillé de fibrinogène. Seule, en effet, dans ces conditions, la tryptaflavine tue les germes qui ont échappé à la centrifugation.

Enfin, nous avons constaté que, produite dans du plasma oxalaté dépouillé de fibrinogène, la coagulase n'agit plus sur le plasma oxalaté, quand elle est restée pendant quarante-huit heures à 37°, mélangée à du formol à la concentration de 3 p. 1.000.

Cette substance semble donc avoir sur la coagulase staphylococcique une action comparable à celle qu'elle exerce sur les toxines.

## ACTION FIBRINOLYTIQUE DE LA STAPHYLOCOAGULASE.

Ainsi que nous l'avons rappelé plus haut, Nolf [5] a observé que le staphylocoque ne coagule pas le fibrinogène en solution pure.

Gratia a montré que la coagulation se produit lorsque, au lieu d'ensemencer de staphylocoques une solution pure de fibrinogène, on ensemence du plasma oxalaté, filtré et phosphaté, qu'il considère, parce que privé des éléments de la thrombine, comme équivalent à une solution pure de fibrinogène.

Gratia a expliqué cette différence d'action du staphylocoque dans ces deux circonstances, en admettant que, dans le premier cas, l'absence de coagulation du fibrinogène résulte de ce que celui-ci ne fournit pas au staphylocoque les éléments nécessaires à sa prolifération, tandis que ce germe les trouve dans le second milieu.

Si cette explication était fondée, la coagulation se produirait également, ainsi que Nolf [7] le suppose, au cas où l'on ajouterait, au fibrinogène ensemencé de staphylocoques, du bouillon pour assurer la prolifération du microbe.

Or, il n'en est rien.

Pour obtenir une solution aussi pure que possible de fibrinogène, nous nous servons de plasma oxalaté, filtré sur bougie (enlèvement du cytozyme) et privé de prosérozyme par un épuisement au phosphate tricalcique. Le fibrinogène est précipité par NaCl, lavé à trois reprises par une solution concentrée de ce sel, redissous ensuite dans l'eau distillée stérile et dialysé quarante-huit heures en présence d'eau physiologique.

Or, dans un mélange de ce fibrinogène pur et de bouillon, le staphylocoque, malgré une prolifération intense, ne détermine aucune coagulation.

Et cependant, il est aisé de constater que, dans ce mélange, le microbe a produit en abondance de la coagulase. Il suffit, pour s'en convaincre, de centrifuger la culture, de chauffer à 60° pendant trente minutes le liquide décanté et, après en avoir vérifié la stérilité, d'en ajouter quelques gouttes (IV à V gouttes par exemple) à du plasma oxalaté (XX gouttes). Celui-ci, mis à 37°, se coagule en masse en quelques heures.



On peut, dès lors, présumer que la coagulation du fibrinogène par le staphylocoque se produira, si l'on ajoute à la solution de fibrinogène non pas du bouillon, mais le liquide obtenu d'un plasma oxalaté, filtré et traité par le triphosphate calcique, que l'on a, en outre, dépouillé de son fibrinogène par NaCl. C'est ce que l'on constate, en effet : le liquide obtenu par ce procédé, dialysé pour éloigner NaCl, contenant encore les albumines et globulines du plasma, additionné, après oxalation, à une solution pure de fibrinogène, — ce qui reconstitue en somme le plasma — permet au staphylocoque de faire coaguler le fibrinogène.

Ainsi donc, la coagulation du fibrinogène par le staphylocoque en présence de plasma dépouillé à la fois de fibrinogène ainsi que des éléments de la thrombine, et l'absence de coagulation quand ce plasma est remplacé par du bouillon, ne sont pas dues à des différences dans la prolifération du germe dans ces milieux, pas plus qu'à des différences dans la production de coagulase par le microbe, puisque dans les deux cas il y a prolifération microbienne et sécrétion de staphylocoagulase.

*On obtient du reste des résultats identiques si on supprime l'intervention du microbe vivant.*

EXPÉRIENCE 3. — Introduisons dans deux séries de tubes 1 cent. cube de solution pure de fibrinogène oxalatée à 1 p. 1.000, ainsi que des volumes variant de 0 c. c. 1 à 0 c. c. 4 de staphylocoagulase obtenue en bouillon oxalaté et dépouillée de tout germe vivant. Ajoutons aux tubes de l'une de ces séries du bouillon en quantités comprises entre 0 c. c. 4 et 0 c. c. 1 et aux tubes de l'autre série des volumes identiques de plasma débarrassé des éléments de la thrombine et de fibrinogène. Les tubes de la première série restent indéfiniment liquides; ceux de la seconde se coagulent complètement en quelques heures à 37°.

Il va de soi que, si dans un mélange semblable à ceux de la seconde série on n'a pas introduit de staphylocoagulase, aucun caillot ne se forme.

La staphylocoagulase s'est donc montrée indispensable, dans cette expérience, à la coagulation du fibrinogène.

D'autre part, le plasma oxalaté, épuisé de cytozème et de sérozyme, puis privé de son fibrinogène par NaCl, joue également un rôle dans la coagulation du fibrinogène par la staphylocoagulase.

Avant d'étudier le mécanisme de cette action, il convient de montrer que la coagulation n'est pas due, dans ce cas, comme

certains auteurs l'ont prétendu pour la coagulation du plasma oxalaté par le staphylocoque, à la persistance dans ce liquide de prosérozyme et à sa participation dans la coagulation par la staphylocoagulase.

EXPÉRIENCE 6. — Additionnons 0 c. c. 5 de fibrinogène pur, de 0 c. c. 3 de plasma oxalaté, filtré, phosphaté et dépouillé de fibrinogène, puis de 0 c. c. 1 d'une émulsion de plaquettes sanguines (dont on a vérifié au préalable la richesse en cytozyme) et enfin de 0 c. c. 1 d'une solution calcique susceptible de neutraliser, avec un excès suffisant de calcium, l'oxalate des trois premiers liquides. Le mélange reste indéfiniment liquide, ce qui exclut toute présence de prosérozyme ou de sérozyme.

Au surplus, l'hypothèse, non confirmée par les faits, de l'intervention d'un des éléments de la thrombine dans la coagulation du plasma oxalaté par le staphylocoque ou par la staphylocoagulase, de même que dans la coagulation d'une solution de fibrinogène pur par la staphylocoagulase en présence d'un liquide plasmatique, suppose que le fibrinogène en solution pure, non coagulé par le staphylocoque ni par la staphylocoagulase, reste tel quel, non influencé par ces derniers éléments.

Or, tel n'est pas le cas. De même que l'on a vu depuis longtemps (v. plus haut) que le staphylocoque lyse le caillot, qu'il a produit dans du plasma oxalaté, de même on peut constater aisément que, sous l'influence du staphylocoque, le fibrinogène en solution pure est lysé.

EXPÉRIENCE 7. — Il suffit, pour s'en assurer, de centrifuger deux tubes contenant une même quantité de fibrinogène en solution pure, dont l'un a étéensemencé de staphylocoques, tous deux ayant ensuite été placés à 37° pendant un à deux jours. Si on porte ensuite à 58° pendant trente minutes les deux liquides décantés, le liquide du tube nonensemencé se trouble par thermocoagulation du fibrinogène, tandis que le liquide du tubeensemencé reste absolument limpide.

On peut faire des constatations identiques si au lieu d'ensemencer le fibrinogène de staphylocoques, on l'additionne de staphylocoagulase obtenue en bouillon oxalaté et dépouillé de tout germe vivant. Sous l'influence de doses de staphylocoagulase égales à 1/8, voire à 1/100 et 1/200 du volume de la solution de fibrinogène employée, ce dernier est digéré en vingt-quatre à quarante-huit heures à 37° et ne se coagule plus ensuite par un chauffage à 60°. Le bouillon oxalaté, par contre, à

quelque dose qu'il agisse, est évidemment inactif sur le fibrinogène.

A vrai dire, toutes les expériences ne montrent pas, comme l'indique la description ci-dessus, le passage du fibrinogène de son état primitif à l'état lysé sous l'influence de la staphylocoagulase, sans qu'aucune modification n'apparaisse, à aucun moment, dans l'aspect de la solution.

Si l'on peut observer d'une manière suffisamment continue l'action de la staphylocoagulase, on peut saisir un moment où la solution liquide et transparente de fibrinogène devient visqueuse, prend ensuite l'aspect d'un caillot mou ne persistant que pendant un temps assez court, puis redevient visqueuse et enfin entièrement liquide.

La staphylocoagulase fait donc passer le fibrinogène par un stade de coagulation qui n'est que passager, parce que survient, peu après son début, la digestion du caillot formé. La coagulation apparaît dès lors comme une étape de la transformation infligée au fibrinogène par la staphylocoagulase. Le sort définitif du fibrinogène sous l'influence de la sécrétion staphylococcique est de subir la digestion et la staphylocoagulase a, en réalité, une action protéolytique. Nos recherches apportent, comme on le voit, des arguments intéressants à l'hypothèse émise par Gratia [41].

Les faits suivants permettent d'admettre, du reste, que le pouvoir coagulant et la propriété fibrinolytique des cultures en bouillon stérilisées que nous appelons « staphylocoagulase » sont bien dus à la même substance.

Nous avons vu précédemment la remarquable thermostabilité de leur pouvoir coagulant, sa résistance au vieillissement, à la dessiccation et l'échec de la dialyse. De même, la propriété fibrinolytique persiste dans ces cultures, quels que soient leur âge, la dessiccation à laquelle elles sont soumises, la durée de la dialyse, de même qu'elle résiste parfaitement à un chauffage à 100° pendant quinze minutes.

\*  
\* \*

Ces constatations permettent d'aborder plus fructueusement l'étude du mécanisme de la coagulation du fibrinogène par la staphylocoagulase, en présence du liquide retiré du plasma



oxalaté, quand on en a soustrait les éléments de la thrombine et le fibrinogène.

Ce liquide contient encore les albumines et les globulines du plasma.

Séparons ces deux éléments par saturation au chlorure sodique ou par addition d'une quantité suffisante de sulfate ammonique; après dialyse, en présence d'eau physiologique, oxalatons-les à 1 p. 1.000.

On peut ainsi rechercher leur influence respective sur l'action de la staphylocoagulase à l'égard de la solution de fibrinogène en milieu oxalaté.

EXPÉRIENCE 8. — L'influence des globulines est établie par l'essai suivant : faisons agir sur un volume constant de fibrinogène une dose fixe de staphylocoagulase, en présence de quantités décroissantes de globulines, le milieu étant oxalaté à 1 p. 1.000. Notons les mélanges où la coagulation se produit, puis observons ceux où le caillot persiste et ceux où il disparaît.

Portons enfin ultérieurement à 59° pendant trente minutes tous les tubes non coagulés et ceux dont le caillot s'est redissous, pour établir si le fibrinogène est resté intact ou s'il a été lysé.

TUBES	SOLUTION OXALATÉE de fibrinogène	STAPHYLOCOAGULASE	GLOBULINE en solution oxalatée	EAU PHYSIOLOGIQUE oxalatée	RÉSULTAT APRÈS		CHAUFFAGE des liquides à 59° après 36 heures
					7 heures à 37°	24 heures à 37°	
	c. c.	c. c.	c. c.	c. c.			
1	0,5	0,2	0,2		Coagulation.	Coagulation.	Pas de précipitation de fibrinogène.
2	0,5	0,2	0,1		Coagulation.	Coagulation.	
3	0,5	0,2	0,05		Coagulation.	Liquide.	
4	0,5	0,2	0,03		Coagulation.	Liquide.	Pas de précipitation de fibrinogène.
5	0,5	0,2	0,02		Liquide.	Liquide.	Pas de précipitation de fibrinogène.
6	0,5	0,2	0,01		Liquide.	Liquide.	Pas de précipitation de fibrinogène.
7	0,5		0,4		Liquide.	Liquide.	Précipitation de fibri- nogène.
8	0,5	0,2		0,2	Liquide.	Liquide.	Pas de précipitation de fibrinogène.
9	0,5			0,4	Liquide.	Liquide.	Précipitation de fibri- nogène.

Nous avons vu plus haut que l'action de la staphylocoagulase sur le fibrinogène aboutit à la lyse de celui-ci en le faisant

passer par un stade transitoire de coagulation généralement incomplète.

L'expérience ci-dessus montre qu'en présence de fortes doses de globuline la staphylocoagulase provoque la coagulation du fibrinogène, mais ne parvient pas à en effectuer la lyse (t. 1 et 2). Les faibles doses, au contraire, n'entravent pas suffisamment l'action de la coagulase, qui peut lyser d'emblée (apparemment du moins) le fibrinogène (t. 5 et 6). Enfin, en présence des doses moyennes de globuline (t. 3 et 4), on voit, à une période prolongée de coagulation, succéder la lyse.

Cette action retardatrice des solutions de globulines — action antifibrinolytique — grâce à laquelle on peut provoquer la prolongation, voire la persistance du stade de coagulation du fibrinogène par la sécrétion staphylococcique, ne disparaît complètement que par un chauffage de trente minutes à 67°, ainsi que le montre l'expérience suivante. Ce fait prouve à l'évidence que la coagulation du fibrinogène ou du plasma oxalaté par le staphylocoque ou la staphylocoagulase ne réclame nullement l'intervention du prosérozyme ou du sérozyme.

EXPÉRIENCE 9. — Elle est faite sur le modèle de la précédente, la globuline ayant été soumise au préalable, pendant trente minutes, aux températures indiquées dans la colonne 4.

TUBES	SOLUTION OXALATÉE de fibrinogène	STAPHYLOCOAGULASE	GLOBULINE OXALATÉE à 0 c.c. 3	EAU PHYSIOLOGIQUE oxalatée	RÉSULTAT APRÈS		CHAUFFAGE des liquides à 59° après 48 heures
					24 heures à 37°	48 heures	
1	0,5	0,2	Gl. fraîche.	c.c.	Coagulation.	Coagulation.	Pas de précipitation de fibrinogène.
2	0,5	0,2	Gl. à 55°.		Coagulation.	Coagulation.	
3	0,5	0,2	Gl. à 58°.		Coagulation.	Coagulation.	
4	0,5	0,2	Gl. à 61°.		Coagulation.	Liquide.	
5	0,5	0,2	Gl. à 64°.	0,3	Coagulation.	Liquide.	Pas de précipitation de fibrinogène.
6	0,5	0,2	Gl. à 67°.		Liquide.	Liquide.	
7	0,5	0,2			Liquide.	Liquide.	
8	0,5				Liquide.	Liquide.	
				0,5			Précipitation de fibrinogène.

Le chauffage à 55-58° n'atténue donc que faiblement l'influence empêchante de la globuline, qui entrave encore suffisamment l'action de la staphylocoagulase, pour que le stade de coagulation ne soit pas dépassé. Aux températures de 61-64°, l'atténuation de l'action de la globuline n'est plus suffisante pour s'opposer définitivement à la fibrinolyse par la staphylocoagulase ; mais cette fibrinolyse est tardive. Chauffée à 67°, la globuline perd toute action antagoniste et la staphylocoagulase lyse sans entrave le fibrinogène.

L'influence antagoniste exercée par les albumines plasmatiques sur l'action de la staphylocoagulase est beaucoup plus énergique.

EXPÉRIENCE 10. — Si nous introduisons dans une série de tubes 0 c. c. 5 de solution oxalatee de fibrinogène pur, 0 c. c. 2 de staphylocoagulase et des doses décroissantes (de 0 c. c. 2 à 0 c. c. 005) de solution oxalatee d'albumine, la coagulation y fait constamment défaut, ou, si elle se produit, est trop passagère pour qu'on puisse la saisir. Si on porte les mélanges, restés de la sorte liquides, pendant trente minutes à 58-60°, le fibrinogène est précipité par la chaleur dans les tubes contenant les fortes doses d'albumine (0 c. c. 2 et 0 c. c. 1) ; la précipitation n'est que partielle dans les tubes renfermant des doses plus faibles (0 c. c. 05 à 0 c. c. 005), c'est-à-dire qu'à ces doses, l'influence antagoniste des albumines sur l'action de la staphylocoagulase n'est plus qu'incomplète.

On peut enfin constater que l'action antagoniste des albumines persiste malgré le chauffage, jusqu'aux températures où leurs solutions sont elles-mêmes précipitées par la chaleur.

Cette thermo-précipitation s'est produite, pour les solutions d'albumine que nous avons utilisées, par un chauffage de trente minutes à 67°. Or, les albumines chauffées à 64° pendant le même temps exercent encore une influence antagoniste intense sur l'action de la staphylocoagulase. En leur présence, celle-ci ne coagule ni ne lyse le fibrinogène, si la quantité d'albumine employée est suffisante.

\*  
\* \*

L'action du staphylocoque sur les plasmas sanguins apparaît ainsi comme très comparable à celle de la thrombine dans la coagulation du sang. Divers savants, particulièrement Bordet et Gengou, Bordet et Delange, ont apporté des renseignements précieux sur le mécanisme de la formation de la thrombine dans



le sang recueilli *in vitro*. Ils ont montré notamment, qu'une fois constituée aux dépens des divers éléments qui participent à sa formation, la thrombine — ou plus exactement le sérum sanguin contenant la thrombine fraîchement apparue — est capable de coaguler le plasma en l'absence de sels de chaux.

Nolf, portant son attention sur le sort ultérieur du caillot ainsi obtenu, a constaté que la solidification du plasma par la thrombine ne constitue pas la fin ultime du fibrinogène. Le caillot subit, en effet, dans certaines circonstances qu'il convient de rappeler, la fibrinolyse.

Cette fibrinolyse s'observe tout particulièrement quand, en milieu oxalaté, on fait agir sur une solution de fibrinogène une solution de thrombine, purifiée autant que possible des albumines et globulines sériques par des procédés tels que celui qu'a préconisé autrefois Al. Schmidt. On observe alors, après la coagulation du fibrinogène, la dissolution du caillot, coagulation et fibrinolyse attribuées toutes deux par Nolf [6] à l'action de la thrombine elle-même.

Au contraire, si on introduit une solution de thrombine dans du plasma oxalaté, ou dans une solution de fibrinogène additionnée de sérum inactivé, c'est-à-dire dans un liquide contenant à la fois du fibrinogène et les autres matières protéiques du plasma, on observe la coagulation, tandis que la fibrinolyse n'apparaît pas ou est très retardée (Nolf [8]).

Ainsi que Nolf l'a établi, il existe dans le plasma originel des forces antagonistes de la fibrinolyse. Il a montré qu'elles sont de même opposées à la coagulation. Il a été amené de la sorte à admettre l'existence, dans le plasma, de substances à la fois antithrombiques et antifibrinolytiques, qu'il considère comme des matières protéiques.

Ces substances se retrouvent dans les solutions de globulines et d'albumines sériques, tout particulièrement dans ces dernières.

Nous croyons avoir montré que l'action du staphylocoque sur le fibrinogène et sur les plasmas est très comparable aux faits qui viennent d'être brièvement rappelés.

Sans qu'il soit question d'assimiler la sécrétion active du staphylocoque à la thrombine, nous constatons que toutes deux font coaguler le plasma sanguin en l'absence de calcium. Toutes

deux, après avoir provoqué la coagulation du fibrinogène pur, le digèrent. Ces phénomènes sont, au contraire, entravés d'une manière plus ou moins complète dans les deux cas, par l'intervention de substances normalement contenues dans le plasma.

Nolf a attribué à l'intervention antifibrinolytique de ces dernières substances un but finaliste, en ce sens que la formation d'un caillot étant le moyen naturel d'arrêt d'une hémorragie, l'obstacle opposé par les substances antifibrinolytiques à la digestion du caillot par la thrombine apparaît comme une mesure de sauvegarde de l'organisme. Nous croyons que cette conception n'est pas rigoureusement justifiée, car, si elle satisfait l'esprit quand il s'agit de la coagulation normale du sang, elle s'applique mal aux modifications successives que le staphylocoque imprime au fibrinogène. La coagulation que l'on observe dans ce cas ne peut être considérée comme une mesure de sauvegarde ; c'est au contraire un incident qui peut être grave pour l'individu.

Par contre, les modifications que subit le fibrinogène sous l'influence du staphylocoque (coagulation d'abord, fibrinolyse ensuite) apparaissent comme les étapes du processus par lequel le germe utilise le fibrinogène pour sa propre nutrition. Il les provoque, grâce à la sécrétion d'une substance, dont nous avons pu constater la présence et l'action dans les cultures de ce microbe, débarrassées ensuite de ce dernier. Les faits que nous avons décrits à ce sujet et qui précisent le mécanisme des observations dues antérieurement à d'autres auteurs se servant du staphylocoque lui-même rentrent, en réalité, dans le cadre général des phénomènes de nutrition.

#### CONCLUSIONS.

1° La coagulation du plasma oxalaté par le staphylocoque ne réclame pas le concours de l'un des constituants de la thrombine ou de plusieurs d'entre eux.

2° La coagulation du plasma oxalaté par le staphylocoque et la lyse ultérieure du caillot sont dues à une seule substance sécrétée par le microbe, même dans des milieux ne contenant pas de fibrinogène, tels que le bouillon.

3° Soumis à l'action de cette substance, le fibrinogène pur n'offre qu'une coagulation de courte durée, souvent incomplète. mais subit par contre une digestion rapide.

4° La substance sécrétée par le staphylocoque est, en réalité, un agent fibrinolytique; la coagulation du fibrinogène — comme celle du plasma oxalaté — n'est qu'un stade de son action, la digestion étant le sort ultime du fibrinogène. L'action de cette substance rentre dans le cadre des phénomènes de nutrition.

5° Les substances antilytiques existant normalement dans le plasma et dans le sérum même inactivé ralentissent l'action de la sécrétion staphylococcique ou s'y opposent. C'est à leur présence qu'est due, dans les mélanges de cette sécrétion et de plasma oxalaté, la prolongation du stade de coagulation si aisée à constater.

6° Les solutions de globulines du sérum ont une action antilytique modérée; suivant les doses employées, elles permettent la coagulation mais non la lyse du fibrinogène par la sécrétion staphylococcique, ou bien elles laissent celle-ci effectuer ensuite la lyse tardive du caillot, ou enfin elles n'entravent pas la digestion d'emblée du fibrinogène.

7° Les solutions d'albumines sériques ont une action antilytique beaucoup plus intense.

8° Les modifications subies par le fibrinogène et le plasma oxalaté sous l'action de l'agent staphylococcique sont comparables à celles que subissent ces substances sous l'influence de la thrombine.

9° L'agent fibrinolytique sécrété par le staphylocoque résiste au vieillissement, à la dessiccation, est thermostable et ne dialyse pas. Il est aisément retenu par les filtres.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] MUCH : *Biochem. Zeitschr.*, vol. XIV, 1908.
- [2] KLEINSCHMIDT : *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, vol. III, 1909.
- [3] GONZENBACH : *Centralbl. f. Bakter.*, vol. LXXVIII, 1916.
- [4] DELREZ et GOVAERTS : *Ambulance de l'Océan*, 2, 1918.
- [5] NOLF : *Arch. intern. de Physiol.*, 6, 1908.
- [6] NOLF : *Ibid.*, 18, 1921.
- [7] NOLF : *Traité du sang*, 1, 1932, p. 45.



- [8] NOLF : *Ibid.*, p. 53 et 54.
- [9] GRATIA : *Soc. belge de Biol.*, 82, 1919.
- [10] GRATIA : *Ibid.*, 83.
- [11] GRATIA : *Arch. intern. de Physiol.*, 1921, p. 355.
- [12] GRATIA : *Soc. belge de Biol.*, 85, 1921.
- [13] VAN BRUSSEHEM : *Ibid.*, 1932.

## AU SUJET DU RÔLE DE LA PEAU DANS L'INFECTION CHARBONNEUSE

QUELQUES REMARQUES  
A PROPOS DU MÉMOIRE DE MM. BOQUET ET SAENZ (1)

par A. BESREDKA.

1° RÉCEPTIVITÉ DES MUQUEUSES. — MM. Boquet et Saenz ont jugé nécessaire de rappeler combien grande est, dans l'infection charbonneuse naturelle, l'importance des muqueuses. A propos de la muqueuse intestinale, ils évoquent « les champs maudits », les ravages du charbon chez les bovidés et les ovins avant Pasteur, le rôle du sol et des eaux d'alimentation, les résultats heureux d'une prophylaxie fondée sur la migration des troupeaux et sur l'interdiction des pâturages suspects, etc. Ce sont, certes, des faits d'un immense intérêt, qui nous remettent en mémoire l'œuvre pasteurienne; mais ils ajoutent qu'en dépit de ces notions classiques « Besredka ne fit *jamais* allusion à la vulnérabilité des muqueuses *avant les recherches de l'un de nous à ce sujet* ».

Or, c'est précisément parce que ces notions sont devenues classiques que nous n'avons pas jugé opportun de nous y appesantir. Aucun des lecteurs des *Annales*, avons-nous pensé, n'ignore cette histoire du charbon, que l'on relit, d'ailleurs, toujours avec plaisir et profit. Qu'on veuille bien se reporter à notre ouvrage sur *L'Immunisation locale*, paru en 1925, dont le premier chapitre, consacré au charbon, n'occupe pas moins de 60 pages; qu'on veuille bien aussi consulter, dans le même ordre d'idées, notre Revue dans le *Bulletin de l'Institut Pasteur*, parue antérieurement, où nous rendons, au point de vue de la sensibilité au charbon, solidaires la peau et les muqueuses; à ce sujet, nous rappelons que « la sensibilité de la muqueuse qui est le prolongement de la peau, notamment celle de la

(1) Ces *Annales*, 50, mars 1933, p. 311.

muqueuse intestinale du mouton, a été mise en évidence dans les expériences classiques de Pasteur, Roux et Chamberland » (1).

Ce n'est pas parce que, comme il ressort des expériences de MM. Boquet et Saenz, 1 cobaye sur 6 infectés *per os* meurt de charbon, après avoir reçu la dose formidable d'un tiers de boîte de Roux, que l'on peut invoquer la sensibilité de la muqueuse intestinale du cobaye. Ce n'est pas parce que, dans les expériences de notre collaboratrice, M<sup>me</sup> Aïtoff, sur un grand nombre de cobayes ayant reçu en instillation dans l'œil une dose incommensurable de bactériidies, 2 femelles pleines sont mortes, qu'il est permis de parler de la réceptivité de la conjonctive au charbon. Nous affirmons, une fois de plus, que toutes les muqueuses — intestinale, oculaire, linguale et autres — sont réfractaires au charbon tant qu'elles sont intactes et que, par contre, ces muqueuses deviennent extrêmement sensibles dès qu'elles présentent la moindre solution de continuité. Il est donc tout naturel que dans les expériences de MM. Boquet et Saenz, où les bactériidies sont inoculées *sous* la muqueuse conjonctivale, *sous* la muqueuse linguale ou bien par la voie *transthoracique* ou *transdiaphragmatique*, les cobayes succombent à l'infection charbonneuse. Le contraire nous aurait profondément surpris.

Avant de passer à la réceptivité de la peau, qu'il nous soit permis de faire une légère digression au sujet de l'expérience déjà citée de M<sup>me</sup> Aïtoff; voici à quel titre cette expérience nous parut suggestive. Dans l'arsenal microbien courant, nous connaissons deux germes qui sont éminemment virulents pour le cobaye : la bactériдие et le bacille tuberculeux, l'un et l'autre tuant à l'unité, le premier en quelques jours et le second en quelques mois. Comme l'a montré autrefois Calmette et comme nous l'avons souvent observé depuis, il suffit de déposer sur la conjonctive du cobaye une dose minime de virus tuberculeux, pour assister dans la suite à une tuberculose généralisée. On conçoit donc que nous ne pûmes nous empêcher d'être impressionné, ayant constaté que des bactériidies, administrées au cobaye dans les mêmes conditions et à des

(1) 31 mars 1924, p. 217.



doses infiniment supérieures, le laissaient complètement indifférent.

2° RÉCEPTIVITÉ DE LA CAVITÉ PÉRITONÉALE. — MM. Boquet et Saenz admettent que la résistance de la cavité péritonéale à l'infection charbonneuse est un phénomène « intéressant ». Mais ils ajoutent que « la résistance du péritoine n'est pas particulière à l'infection charbonneuse : la microbiologie expérimentale en contient des exemples non moins significatifs ». Quels sont ces exemples? Quant à nous, nous avouons ne pas en connaître. Tout au contraire, nous connaissons des exemples très nombreux d'un ordre diamétralement opposé. Qu'il s'agisse de bacilles typhiques ou paratyphiques, de vibrions cholériques, de bacilles dysentériques, de bacilles pesteux, de staphylocoques, de colibacilles et d'autres germes du contenu intestinal, la cavité péritonéale se montre toujours moins résistante que les tissus sous-cutanés et surtout intra-cutanés. En médecine humaine aussi, les chirurgiens savent ce qu'il leur en coûte de contaminer le péritoine. MM. Boquet et Saenz ont certainement observé aussi avec le virus tuberculeux qu'ils ont spécialement étudié que ce virus — qu'il s'agisse de cultures ou de crachats — est beaucoup plus meurtrier en inoculation dans le péritoine que sous la peau. Cela étant, pouvaient-ils croire que nous n'avions pas été vivement impressionné de cette inversion de virulence dont la bactériémie nous fournit un exemple aussi démonstratif qu'inattendu?

3° RÉCEPTIVITÉ DE LA PEAU. — Si la bactériémie charbonneuse se comportait comme la plupart des microbes pathogènes, l'inoculation *dans* la peau, en raison de la densité de cette dernière et de la lente résorption qui a lieu à ce niveau, aurait dû être notablement moins grave que l'inoculation *sous* la peau. Or, c'est précisément le phénomène inverse qui s'observe. Rappelons à ce sujet les expériences de Plotz, ainsi que celles de Baltéano. Ces auteurs enfermèrent des bactériémies dans des sacs en collodion, puis placèrent ceux-ci sous la peau. Quelques jours après, ayant libéré les bactériémies sur place, ils ont constaté que celles-ci, impuissantes à infecter

leur hôte, avaient cependant conservé leur virulence et étaient capables de donner le charbon à d'autres lapins dans les conditions ordinaires d'inoculation.

Faisons remarquer que, même dans les cas où l'on ne prend aucune précaution spéciale pour éviter un traumatisme cutané, l'inoculation des bactériidies *sous la peau* est sensiblement moins meurtrière que celle pratiquée *dans la peau*. Nous n'avons qu'à nous reporter aux expériences mêmes de MM. Boquet et Saenz. Ainsi, il ressort de leur expérience résumée dans le tableau I que, pour tuer le cobaye au moyen du virus charbonneux par la voie sous-cutanée, il en faut une dose cinq fois supérieure à celle qui tue par la voie intra-cutanée.

Tout en se défendant de reconnaître le rôle primordial de la peau dans le mécanisme de l'infection charbonneuse, MM. Boquet et Saenz rapportent une expérience qui mérite d'une façon spéciale de retenir l'attention. Ces auteurs font ingérer à des cobayes, à jeun depuis trente-six heures, des spores et des bactériidies (un tiers de boîte de Roux). Sauf des cas très rares, ces cobayes restent sains et saufs. On aurait pu penser que cette résistance des cobayes tient à la destruction du virus dans le tube digestif. Or, il n'en est rien. Lorsque, dans les heures qui suivent l'ingestion du virus, onensemence le sang, on obtient, six fois sur dix, une culture pure de bacilles charbonneux. Cela ne veut-il pas dire que, bien que les bactériidies soient en circulation dans le sang et pénètrent dans les organes, elles sont incapables de provoquer la moindre infection apparente?

Désireux de se rendre compte si les animaux en question étaient vaccinés, MM. Boquet et Saenz ne manquèrent pas de constater qu'il n'en était rien, qu'ils continuaient à être aussi réceptifs que les animaux neufs. Aussi firent-ils remarquer avec raison que « ces animaux ainsi que ceux de Besredka, qui restent indemnes après l'inoculation intraveineuse de bactériidies, effectuée sans souillure de la peau, conservent toute leur réceptivité charbonneuse ».

Mais voici où cette expérience devient particulièrement intéressante. S'inspirant des recherches anciennes de Calmette et Guérin sur la vaccine, ces auteurs ont soumis leurs cobayes à

un traumatisme cutané. Or, ces animaux qui avaient résisté si victorieusement à l'ingestion du virus, qui hébergeaient impunément des bactériidies dans tous les recoins de leur organisme, succombèrent invariablement au charbon dès qu'en ponctionnant leur cœur on lésait leur peau. « Chez la plupart d'entre eux », nous disent MM. Boquet et Saenz, « l'autopsie permit de constater la présence d'un œdème caractéristique du tissu cellulaire sous-cutané *autour du point de pénétration de l'aiguille* ».

Dans une autre expérience, des cobayes ayant également ingéré du virus ont été soumis à des traumatismes cutanés, tels que : épilation, scarification ou contusion. A la suite de ces traumatismes, les cobayes contractèrent un charbon mortel, alors que les cobayes du même lot (8 sur 9), n'ayant subi de traumatisme cutané, restèrent indemnes. Ces faits ne nécessitent aucun commentaire. Aussi ne fûmes-nous pas peu étonné en lisant à la fin du mémoire la phrase que voici : « Contrairement à l'opinion de Besredka, la peau ne jouit pas d'une sensibilité exclusive à l'égard du charbon. »

Si, après lecture du mémoire de MM. Boquet et Saenz, nous avons eu à formuler les conclusions qui découlent de leurs expériences, voici en quels termes nous les aurions présentées :

1) Alors que la peau et les muqueuses du cobaye, intactes, sont réfractaires au charbon, elles ouvrent, en revanche, la porte à l'infection mortelle dès qu'elles sont traumatisées. Les expériences sur les muqueuses nasale, linguale, trachéo-bronchique, complètent ainsi celles de Pasteur, Roux et Chamberland.

2) Contrairement à la plupart des microbes pathogènes, la bactériдие charbonneuse est incomparablement moins nocive en injection intrapéritonéale que sous-cutanée.

3) Contrairement à la plupart des microbes pathogènes, la bactériдие charbonneuse injectée sous la peau, même sans aucune précaution, est moins nocive qu'en injection intracutanée.

4) La septicémie charbonneuse, consécutive à l'ingestion de virus, reste inoffensive tant que la peau est intacte; cette septicémie cesse d'être silencieuse dès que la peau subit un trau-



matisme : on assiste à l'apparition des lésions cutanées qui aboutissent rapidement à une septicémie mortelle.

Bref, selon nous, les résultats des expériences contenues dans le mémoire de MM. Boquet et Saenz confirment ceux que nous avons publiés dans ces *Annales* en 1921 et ceux de nos collaborateurs parus ultérieurement. Nous voulons donc remercier nos excellents collègues de nous avoir fourni quelques précisions nouvelles sur le mécanisme de l'infection charbonneuse et d'avoir contribué par leurs expériences à faire ressortir le rôle capital de la peau. N'est-ce pas à ce rôle de la peau dans l'infection, faut-il le rappeler, que l'on doit les succès de la cutivaccination anticharbonneuse, entrée aujourd'hui dans la pratique de la médecine vétérinaire ?

## AU SUJET DU RÔLE DE LA PEAU DANS L'INFECTION CHARBONNEUSE

Note de MM. A. BOQUET et A. SAENZ.

I. — Ce que M. Besredka désigne sous le nom de revêtement cutané, de peau proprement dite, ne concerne pas seulement le tégument externe, comme on l'entend d'ordinaire, mais encore « la muqueuse qui en est le prolongement ».

Or, cette définition ne fut donnée qu'en 1924 par M. Besredka, dans le même numéro du *Bulletin de l'Institut Pasteur* où il analysait une de nos notes sur l'infection charbonneuse par voie buccale et conjonctivale. Jusque-là, sa collaboratrice, M<sup>me</sup> Aitoff, admettait l'existence d'une sorte « d'immunité locale naturelle » de la conjonctive *même fraîchement traumatisée*, et M. Besredka affirmait sans restriction que l'affinité de la bactérie « pour le revêtement cutané du cobaye est strictement spécifique, le virus charbonneux n'ayant aucune prise sur d'autres tissus ou organes. » Cette affinité que la peau doit, selon lui, à certaines cellules réceptives se manifesterait avec une rigueur telle, que « si on pouvait par la pensée *dépouiller l'animal de son revêtement cutané*, tout en le laissant en vie, et si on pouvait, *après l'avoir écorché vif*, lui injecter du virus charbonneux en n'importe quel point de son corps, on le verrait opposer au virus une indifférence complète.... La peau étant le seul organe sensible au charbon, *l'intérieur de l'animal* étant naturellement réfractaire à cette maladie... »

II. — En disant que la résistance du péritoine n'est pas particulière à l'infection charbonneuse, nous avons en vue la tolérance des cobayes femelles pour le bacille de la morve (M. Nicolle), celle des bovidés pour les microbes pyogènes et septiques, celle des porcelets pour les pyogènes entre autres. Bien que cette résistance soit nettement plus marquée dans le charbon et qu'elle contraste beaucoup plus avec la réceptivité du derme, nous croyons qu'elle résulte non pas de l'absence de

soi-disant cellules réceptives, mais de l'intervention plus efficace de facteurs cellulaires ou humoraux communs. Cette hypothèse se fonde sur les recherches de B. H. Buxton et J. C. Torrey (1906) relatives à la lyse péritonéale de diverses bactéries pathogènes et sur celles de Sanarelli et Alessandrini, qui mettent en évidence la destruction lytique de la bactériémie par l'exsudat péritonéal du lapin.

III. — Nous pensions que notre désaccord avec M. Besredka provenait avant tout de ce que, avec beaucoup d'autres d'ailleurs, nous n'admettions pas son hypothèse de la réceptivité *exclusive* de la peau, « cette éternelle blessée de toutes nos interventions ». Mais, puisque notre collègue, en reproduisant nos conclusions sous une forme plus concise, étend le champ d'action pathogène de la bactériémie bien au delà du revêtement cutané, nous convenons volontiers de notre méprise, et nous nous réjouissons de lui avoir fourni l'occasion d'élargir sa théorie de la cuti-infection, au point de la rapprocher singulièrement de la théorie classique.



**ATTÉNUATION GRADUÉE, PÉRMANENTE  
ET HÉRÉDITAIRE DE LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE  
PAR LA LYPHE PÉRITONÉALE DU LAPIN**

par G. SANARELLI et A. ALESSANDRINI.

(*Institut d'Hygiène de l'Université de Rome.*)

Dans une note précédente (1), nous avons affirmé que, parmi les microbes qui ne fournissent pas d'éléments susceptibles de passer à travers les parois filtrantes des sacs de collodion, on doit comprendre la *Bactéridie charbonneuse*.

Les expériences que nous avons effectuées en maintenant plongés dans du bouillon à 37°, même pendant plusieurs mois, des sacs de collodion dont l'intérieur contenait des cultures charbonneuses nous ont toujours donné des résultats négatifs.

Dans le bouillon extérieur, nous n'avons jamais constaté le moindre développement bactérien. En outre, nous avons observé que les animaux sensibles au charbon bactérien supportent très bien dans leur péritoine, pendant longtemps, des sacs de collodion contenant des cultures virulentes.

Donc, ni *in vitro* ni *in vivo*, les Bactéridies ne produisent d'éléments capables de traverser les membranes de collodion. Cependant, au contact de la sérosité péritonéale qui réussit à filtrer, plus ou moins, à l'intérieur des sacs, les spores germent et les bactéridies se multiplient.

Mais, comme il a été démontré par l'un de nous (2) il y a bien des années, les Bactéridies ne peuvent plus former de spores à l'intérieur des sacs. En outre, avec le temps, la culture charbonneuse asporogène, après s'être développée au

(1) Démonstration *in vivo* et *in vitro* des formes filtrantes du virus tuberculeux. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 104, 1930, p. 1241.

(2) SANARELLI. Die Ursachen der natürlichen Immunität gegen den Milzbrand. *Centr. für Bakter.*, 1891, p. 497; et : La destruction du virus charbonneux sous la peau des animaux sensibles. *Ces Annales*, 1893, p. 820.

maximum dans les sacs jusqu'à acquérir un aspect presque lactescent, s'épuise peu à peu et s'éteint.

Même en employant les sacs à doubles parois qui nous ont permis de constater directement et facilement la filtrabilité du virus tuberculeux (1) et celle des virus typho-paratyphiques (2), nous n'avons pu observer aucun fait analogue, à savoir : le passage d'éléments filtrables de la loge interne bacillifère dans la loge externe des sacs doubles.

Il semble donc que l'on ne puisse obtenir un ultravirus des Bactéridies charbonneuses.

\*  
\* \*

Si, dans le péritoine des lapins, on introduit des sacs de collodion contenant des cultures charbonneuses avec spores et qu'on les extraye à divers intervalles de temps, on constate que la vitalité du virus se conserve longtemps, mais, par suite de son séjour et de son développement dans le milieu péritonéal, sa virulence va progressivement en s'atténuant.

Nous allons relater ici brièvement quelques séries d'expériences que nous avons effectuées au cours de ces deux dernières années, en employant une souche charbonneuse très virulente — surtout pour les lapins — qui porte dans notre laboratoire le n° 89. Cette souche tue régulièrement les lapins en trente-six à quarante heures, les cobayes et les souris blanches en quarante-huit heures.

Nous avons constaté que ce virus, inclus dans un sac de collodion, au bout de trente-quatre jours de séjour dans le péritoine des lapins, tue encore ces animaux, non plus en trente-six ou quarante heures, mais seulement après soixante heures.

Le même virus demeuré inclus pendant cinquante à soixante jours dans le péritoine ne tue plus le lapin, mais tue encore les cobayes et les souris en quatre jours.

Maintenu dans le péritoine pendant quatre-vingt-trois jours

(1) Culture *in vitro* de l'ultravirus tuberculeux. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 107, 1931, p. 584 et : Études sur l'ultravirus tuberculeux (2<sup>e</sup> mémoire). *Ces Annales* 1933, p. 467.

(2) L'ultravirus typhique. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 108, 1931, p. 405 ; et : L'ultravirus paratyphique. *Ibidem*, p. 460.

le virus ne tue généralement plus ni le lapin, ni le cobaye, ni la souris. Il a perdu toute virulence.

Mais le côté intéressant de ces constatations se trouve surtout dans ce fait que les différents degrés d'atténuation progressive, atteints par la B. charbonneuse qui se développe au contact de la lymphe péritonéale du lapin, ne sont pas transitoires, passagers, comme ceux que l'on obtient facilement par l'action des antiseptiques, des hautes températures, des alcalis, des acides, etc., sur les cultures charbonneuses. Ils se montrent, au contraire, fixes, permanents, transmissibles par l'hérédité dans les milieux nutritifs et dans l'organisme des animaux, pendant un nombre indéterminé de générations. Actuellement nous possédons dans notre laboratoire une série de souches charbonneuses de virulence graduellement atténuée, obtenues par le procédé que nous avons décrit, jusqu'à une dernière souche, portant le n° 151, dont le comportement chez les animaux est celui d'un saprophyte banal.

Pendant deux années ces souches ont été réensemencées dans les milieux ordinaires au moins une centaine de fois, et leur degré respectif d'atténuation s'est constamment maintenu. Nous avons observé que ces souches atténuées se montrent un peu plus labiles que la souche originelle dont elles dérivent. Il faut faire les réensemencements tous les deux mois. Si on laisse vieillir la culture, on risque de ne pas obtenir de réensemencements fertiles.

Ces souches atténuées représentent des variétés de la souche originelle; elles résultent de phénomènes de dissociation qui se produisent dans la souche virulente au contact immédiat de la lymphe péritonéale.

Une étude rigoureuse des variations morphologiques et biochimiques de ces souches atténuées et de la souche virulente originelle a été faite dans notre Institut par le Dr N. Favia (1), qui a pu obtenir de toutes ces souches, soit atténuées soit virulentes, trois types de colonies qui correspondent à celles qu'Arkwright a désignées par les lettres R, S et RS, c'est-à-dire colonies normales, modifiées et mixtes.

Favia a observé en outre que, dans les souches atténuées,

(1) Contributo alla dissociazione del B. anthracis. *Annali di Igiene*, 1932, p. 564.



les colonies modifiées (S), au lieu de se trouver parmi les souches qui ont séjourné plus ou moins longtemps dans le péritoine des lapins et qui ont, par conséquent, supporté des stimulations dysgénésiques plus prolongées, se trouvent, au contraire, seulement parmi les souches qui ont le moins souffert. En effet, dans les souches laissées dans le péritoine des lapins pendant trente-quatre, cinquante, soixante et quatre-vingt-trois jours, on rencontre les trois types de colonies R, RS et S, tandis que dans les souches restées dans le péritoine quatre-vingt-onze et cent trente-trois jours, on note seulement les formes à *caput medusæ* typiques (R).

Les vaccins charbonneux pasteurien se comportent d'une façon analogue : dans le premier vaccin, parmi les colonies R on observe seulement quelques colonies à chevelure un peu plus homogène; dans le deuxième vaccin on observe, au contraire, les trois types de colonies.

Il y a donc un parallélisme singulier, au point de vue de la dissociation, entre nos souches atténuées 34, 50, 60 et 83 et le deuxième vaccin pasteurien, de même qu'entre les souches atténuées 94 et 133 et le premier vaccin.

Nous avons comparé notre souche n° 151 avec les cultures obtenues en partant des vaccins de Pasteur 1 et 2, que nous devons à l'obligeance du professeur Lanfranchi, de l'Institut Vétérinaire de Bologne. Notre souche n° 151 correspondrait, par son degré avancé d'atténuation, au premier vaccin de Pasteur. Il n'a pas été possible de faire des comparaisons avec le deuxième vaccin pasteurien, car les cultures de ce vaccin tuent habituellement les lapins et les souris en six jours et les cobayes en quatre jours.

\*  
\* \*

Nous connaissons bien les grandes difficultés qui se présentent et qui ont été déjà signalées par Roux et Chamberland (1) lorsqu'on veut immuniser les lapins et les autres petits animaux de laboratoire contre le charbon; malgré cela nous avons fait, avec nos souches atténuées, des essais de vaccination.

Nous avons traité des lapins, des cobayes et des souris, pen-

(1) Vaccination des lapins contre le charbon. Ces *Annales*, 1887, p. 513.

dant longtemps, par nos vaccins injectés par voie sous-cutanée, péritonéale et intraveineuse, à des doses graduellement croissantes. Nous avons commencé par le vaccin n° 151 — qui est le plus atténué — pour arriver finalement à l'emploi du vaccin n° 34, peu atténué, puisqu'il tue ces animaux seulement après trois jours, au lieu de deux jours.

Nous avons injecté ces divers vaccins à de très longs intervalles, de manière que la durée du traitement (par petites doses d'abord), atteigne, avec beaucoup de ménagement, des doses très élevées surpassant même trois mois.

Disons tout de suite que les animaux supportent assez bien les injections des doses même massives de nos vaccins. Chez les lapins, elles déterminent fréquemment l'apparition d'infiltrations et d'abcès caséeux sous-cutanés qui peuvent atteindre de grandes dimensions, jusqu'à celles d'un œuf de poule. Le contenu de ces abcès (on en observe aussi chez les lapins traités par les vaccins de Pasteur) se montre toujours très riche en Bactéridies charbonneuses.

On peut vider facilement les abcès. Les animaux ainsi opérés guérissent rapidement et supportent ensuite très bien la continuation des injections vaccinales. Rappelons que cette tendance à la formation d'abcès sous-cutanés, à guérison facile, a été déjà signalée par Marchoux (1).

En ce qui concerne les résultats de ces vaccinations que nous avons poursuivies pendant plus d'un an, nous devons déclarer qu'ils ont été bien modestes. Nous avons réussi à vacciner, avec nos souches atténuées, seulement quelques lapins, par voie sous-cutanée, intraveineuse et même péritonéale. Mais nous n'avons obtenu qu'un résultat aussi modeste qu'en employant le vaccin 1 de Pasteur.

Toutefois, dans toutes nos expériences nous avons constaté d'authentiques et solides immunisations spécifiques, contrôlées par des inoculations abondantes, répétées et virulentes, avec la souche n° 89. Il ne s'agissait donc pas d'une simple augmentation passagère de résistance à l'infection expérimentale.

Mais, par cette méthode, il nous a été impossible de vacciner les cobayes, non plus que les souris. Nous avons traité des

(1) Sérum anticharbonneux. Ces *Annales*, 1895, p. 785.

cobayes, selon l'avis de De Nittis (1), en leur inoculant nos vaccins dans un laps de temps de plus de trois mois. Parfois nous les en avons saturés. Mais après avoir supporté 8, 9 et même 10 injections successives très abondantes et de virulence toujours plus élevée les cobayes n'ont pas résisté à l'inoculation de la souche n° 89, virulente.

Nous n'avons pas été plus heureux avec les souris. Mais les insuccès ont été les mêmes par l'emploi des vaccins pasteurien, ce qui ne peut pas nous étonner, car ils ont été signalés par tous les auteurs qui se sont occupés de ce genre d'expériences.

Néanmoins, on doit considérer nos souches charbonneuses atténuées comme de vrais vaccins et non comme de simples cultures ayant subi des modifications passagères.

Nous avons, en effet, essayé de rendre virulente la souche n° 83 (dont l'atténuation n'est pas complète, car elle tue parfois les souris) en la passant sept fois de suite à travers ces petits animaux. Mais nous n'avons jamais constaté que le virus, cultivé après le dernier passage chez la souris pouvait tuer les cobayes. Ces derniers animaux ont supporté fort bien l'injection sous-cutanée même de deux cultures entières sur gélose, obtenues du sang du cœur de la dernière souris morte de charbon. D'ailleurs, ce résultat s'accorde avec les recherches de C. Hruska (2) qui n'a jamais réussi à accroître la virulence du premier vaccin pasteurien par des passages à travers les souris. Bien plus, en effectuant chez ces animaux des passages avec le deuxième vaccin, cet auteur a observé que la Bactéridie, quoique ne redevenant pas virulente pour les cobayes, s'atténue, au contraire, toujours plus pour les lapins.

M<sup>lle</sup> Tsiklinski a trouvé, elle aussi (3), que le passage du premier vaccin pasteurien à travers la souris, animal extrêmement sensible, détermine un affaiblissement plutôt qu'un renforcement de son action pathogène. La virulence de la Bactéridie s'exalterait, au contraire, par son séjour dans un organisme peu sensible.

(1) Sur l'immunité des pigeons et des cobayes vaccinés contre le charbon et sur les propriétés de leur sérum. Ces *Annales*, 1901, p. 769.

(2) Recherches expérimentales sur le charbon. Les vaccins charbonneux. Ces *Annales*, 1923, p. 897.

(3) Recherches sur la virulence de la bactéridie. Ces *Annales*, 1892, p. 453.



L'ensemble de nos essais d'immunisation, qui ont, somme toute, été peu satisfaisants, nous amène à considérer le mécanisme de l'immunisation et celui de la pathogénie du charbon bactéridien comme différents de ceux des autres infections aiguës de nature microbienne.

\*  
\* \*

Comment et pourquoi, dans la cavité abdominale des lapins, animaux si sensibles au charbon, se produit-il une atténuation si profonde et si stable du virus charbonneux?

On doit avant tout exclure que ce phénomène puisse être attribué au seul fait du développement des bactéridies dans un milieu trop limité tel que celui contenu dans un sac de collodion. Nous avons maintenu, plongé au fond de tubes de bouillon, à 37°, pendant cent cinquante jours, des sacs de collodion remplis de spores charbonneuses. Avec le temps, les cultures asporogènes, qui se développaient rapidement au début, vont peu à peu se désagrégeant et se dissolvant. Elles supportent mal le milieu clos dans lequel elles sont enfermées et où les déchets de leur métabolisme s'accumulent, tandis que les substances nutritives s'épuisent. Déjà au bout de quatre-vingt-trois à cent jours, et surtout après cent cinquante jours, le contenu du sac se montre rempli de détritits. Les formes bactériennes entières deviennent de plus en plus rares; plusieurs bactéridies, plus grêles qu'à l'état normal, se montrent même Gram négatives; les ensemencements sur gélose ne donnent lieu qu'à de rares colonies d'un aspect différent de celui caractéristique en *caput Medusæ*. Elles se montrent rondes, régulières et non granuleuses.

Malgré tous ces signes révélant une déchéance manifeste et une dégradation biologique progressive qui annonce la mort prochaine de la culture, les ensemencements sur les milieux ordinaires donnent toujours des cultures qui se montrent douées d'une virulence égale à celle de la souche originelle.

Même après cent jours d'immersion dans le bouillon, la souche charbonneuse n° 89, extraite d'un sac, a tué les lapins en trente-huit heures seulement, comme la souche n° 89 initiale.

On ne peut donc pas admettre que le virus charbonneux ait

pu se transformer, dans nos expériences, en un vaccin fixe, par le seul fait qu'il s'est développé longtemps à l'intérieur des sacs et à l'abri direct de l'oxygène de l'air.

La modification biologique obtenue, c'est-à-dire l'atténuation permanente et héréditaire, relève donc de l'action prolongée de la lymphe péritonéale qui agit — ainsi que nous allons le voir — comme une diastase antimicrobienne puissamment dissolvante.

\*  
\* \*

Les expériences *in vitro* et, surtout, *in vivo*, que nous avons faites avec la coopération de notre élève, le D<sup>r</sup> E. Giacobini, nous en ont donné, en effet, la démonstration la plus évidente.

Si l'on extrait aseptiquement de la sérosité péritonéale chez un lapin et que, sans l'inactiver, on l'introduise dans des tubes de verreensemencés ensuite avec des spores charbonneuses et placés à 37°, on observe que, pendant quelques jours, les spores ne donnent aucun signe de germination.

C'est seulement au bout de trois à quatre jours qu'apparaît, nageant sur le ménisque liquide, un minuscule flocon qui représente une culture tout à fait rudimentaire. Cette culture se développe avec beaucoup de difficulté; elle reste toujours pauvre et superficielle, laissant la lymphe complètement transparente.

Fort intéressante est l'expérience suivante : Si l'on injecte dans le péritoine d'un lapin une dose quelconque de B. charbonneuses et qu'on sacrifie l'animal trois heures après, on observe que, dans l'abondante sérosité péritonéale aspirée avec une pipette, le nombre des B. charbonneuses, même à la température de laboratoire, au lieu d'augmenter, va progressivement en diminuant. Au bout de six à sept jours la sérosité deviendra absolument stérile! Le pouvoir destructeur de la lymphe péritonéale a tué et lysé toutes les bactéridies.

Les bactéridies extraites de la cavité abdominale d'un lapin qui avait reçu, quatre heures auparavant, dans le péritoine, deux cultures entières sur gélose, au lieu de tuer les lapins en trente-six à quarante heures comme d'habitude, les a tués en cent quarante-quatre heures!

Plus démonstrative encore a été l'étude du comportement des bactéridies charbonneuses dans la cavité péritonéale du

lapin : si l'on injecte dans le péritoine d'un de ces rongeurs deux cultures sur gélose jeunes (de douze heures) et qu'on sacrifie l'animal quatre à cinq heures après, on trouve parfois que la lymphe péritonéale est déjà devenue complètement stérile. Les bactériidies y sont détruites et elles ont déjà disparu du sang circulant et du foie. On en isole seulement quelques-unes de la pulpe splénique.

Toutefois, malgré cette destruction si rapide et si massive des bactériidies, l'animal succombe au charbon dans le laps de temps habituel. En effet, quinze heures après, on commence à découvrir de nouveau des bactériidies et à en obtenir des cultures à partir du liquide péritonéal et de la pulpe du foie. Au bout de vingt heures elles réapparaissent aussi dans le sang et, à la trentième heure, on constate déjà l'invasion septicémique, qui fera mourir le lapin dans le délai normal.

Les propriétés énergiquement antimicrobiennes de la lymphe péritonéale se sont donc révélées, dans nos expériences, tellement évidentes, qu'elles peuvent être considérées comme la cause de l'atténuation progressive que subissent les bactériidies charbonneuses restées en contact avec la lymphe elle-même, à l'intérieur des sacs de collodion.

\*  
\* \*

Il reste à se demander pourquoi les lapins qui ont reçu une injection de bactériidies dans le péritoine succombent inévitablement au charbon, malgré le fort pouvoir microbicide de la lymphe péritonéale.

A cette question on pourrait répondre en rappelant quelques notions, anciennes ou récentes, mises en lumière par un grand nombre de recherches expérimentales.

Sawtchenko (1), Bail (2), Giusti (3), Kodama (4), Solovieff (5)

(1) Contribution à l'étude de l'immunité. Ces *Annales*, 1897, p. 865.

(2) Untersuchungen ueber natürliche und künstliche Milzbrandimmunität. *Centr. für. Bakter.*, Or. 1, 1903, p. 343.

(3) Sulla immunità naturale delle volpi verso il carbonchio, ecc. *Riv. d'Igiene e Sanità Pubblica*, 1905, p. 342.

(4) Die Ursache der natürlichen Immunität gegen Milzbrandbacillen. *Centr. für. Bakter.*, 68, 1913, p. 373.

(5) De la cuti-immunisation du cobaye contre le charbon. Ces *Annales*, 1928, p. 200.

et tant d'autres auteurs ont, en effet, démontré qu'il n'y a aucun rapport entre la présence d'anticorps dans le sérum sanguin et dans les humeurs, et la sensibilité des différentes espèces animales vis-à-vis du charbon. Par exemple les souris blanches, alors même que leur sérum est fortement bactéricide, meurent de charbon; on éprouve de grandes difficultés à les immuniser contre cette infection. Le sérum de certains animaux sensibles, comme le lapin et le cheval, jouit d'un pouvoir bactéricide très marqué envers la bactériidie, tandis que le sérum d'animaux réfractaires, comme la poule, le chien, le renard, etc., en est complètement dépourvu.

Sans doute on voudrait expliquer ces faits — si mystérieux — en s'appuyant sur les publications récentes de A. Besredka (1). Selon cet auteur, la sensibilité ou la non-sensibilité d'un organisme au charbon est commandée seulement par la manière dont réagit son appareil cutané. Suivant Besredka, la peau serait le seul organe sensible au charbon. La bactériidie charbonneuse serait inoffensive pour les autres tissus ou organes. En vaccinant la peau on mettrait l'animal à l'abri de la bactériidie. Par conséquent, les vaccinations effectuées par d'autres voies ne seraient pas efficaces.

Or, on sait que beaucoup d'auteurs n'ont pas pu confirmer ces vues de Besredka. Alors même qu'on reconnaîtrait dans la peau l'organe le plus sensible à l'infection charbonneuse, il est manifeste qu'elle ne constitue pas le seul organe vulnérable par la bactériidie. Bachmann, Beltrami et Romat (2), Combiesco (3), Boquet (4), Gratia (5), Zironi (6), Neri (7),

(1) Charbon : cuti-infection, cuti-vaccination, cuti-immunité. *Ces Annales*, 1921, p. 421.

(2) Voies d'infection pour le charbon expérimental. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 89, 1923, p. 1122.

(3) Recherches sur le mécanisme de l'infection charbonneuse. Rôle de la peau, etc. *Ibidem*, 1923, p. 639.

(4) Rôle des traumatismes dans l'infection charbonneuse, etc. *C. R. de l'Acad. des Sciences*, 1924, p. 260; et : Sur l'infection charbonneuse du cobaye par inoculation sous-muqueuse, etc. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 90, 1924, p. 72.

(5) Infection charbonneuse et immunité anticharbonneuse obtenues par la voie sanguine. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 91, 1924, p. 113.

(6) Sulla recettività al carbonchio e sulla natura della immunità anticarbonchiosa. *Bol. dell' Istit. Sieroter. Milanese*, 3, 1924, p. 181.

(7) Sull'azione patogena del *B. anthracis*. *L'Igiene Moderna*, 1924, p. 69.



Glusman (1), Corona (2), Tada Shigeru (3), Lanfranchi et Casalotti (4), Basset (5), et l'un de nous (6) ont démontré que les pounons, le foie, la rate, les testicules, les muscles, le péritoine, le sang, etc., sont autant d'organes ou de tissus dans lesquels peut se développer l'infection charbonneuse.

Enfin, même en admettant que la voie intracutanée [pour les raisons exposées par A. Gratia] (7) facilite plus que la voie sous-cutanée la production d'anticorps immunisants, les expériences de Feltz (8), de Pasteur, Roux et Chamberland (9), de Marchoux (10), de Gratia (11), de Schilling (12), de Combiesco (13), etc., ont démontré que l'on peut vacciner des animaux très sensibles, comme les lapins, soit par voie sous-cutanée, soit par voie intraveineuse. Récemment Boquet et Saenz (14) ont réussi à vacciner des souris blanches par voie sous-cutanée, au niveau de la queue.

Au cours de nos expériences, et par l'emploi de nos vaccins, nous avons également pu vacciner — quoique en subissant des pertes — des lapins par voies sous-cutanée, intraveineuse et péritonéale.

(1) Negative Resultate bei Immunisierung von Meerschweinchen gegen Milzbrand nach der Methode von Besredka. *Zeitschr. f. Hygiene*, 1924, p. 218.

(2) Sull'importanza della cute nel determinismo dell' infezione da carbonchio ematico. *Pathologica*, 1924, p. 389.

(3) Ist die Milzbrandimmunität an das Hautorgan gebunden? *Centr. für Bakter.*, O. 1924, p. 477.

(4) Cuti e intratesticolare infezione da carbonchio ematico. *Bul. d. Scienze Mediche di Bologna*, 2, 1924, p. 398.

(5) Réceptivité du cobaye et du lapin au virus du charbon bactérien. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 92, 1925, p. 1513 et : Réceptivité du péritoine et du sang pour *B. anthracis*. *Ibidem*, 93, 1925, p. 413.

(6) Sanarelli. Sur la pathogénie du charbon dit « interne » ou « spontané ». *Ces Annales*, 1925, p. 209.

(7) Production d'anticorps dans la cuti-immunité anticharbonneuse. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 91, 1924, p. 795.

(8) Sur le rôle des vers de terre dans la propagation du charbon et sur l'atténuation du virus charbonneux. *C. R. de l'Acad. des Scienc.*, 95, 1882, p. 859.

(9) Immunisation des lapins contre le charbon. *Ces Annales*, 1887, p. 513.

(10) Sérum anticharbonneux. *Ces Annales*, 1895, p. 785.

(11) Infection charbonneuse. *Loc. cit.*

(12) Studies on anthrax immunity. I. *Journ. of Infect Diseases*, avril 1926, p. 295.

(13) Vaccination anticharbonneuse. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 97, 1927, p. 1735.

(14) Essai de vaccination de la souris blanche contre l'infection charbonneuse. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 103, 1930, p. 378.

Tous ces faits tendent à prouver non seulement que la sensibilité au charbon n'est pas du domaine exclusif de la peau, mais que l'on peut aussi réaliser la vaccination contre le charbon par d'autres voies que par la peau.

Il ne semble pas, cependant que, dans l'état actuel de nos connaissances, malgré d'innombrables recherches sur cette vieille question, on ait réussi à expliquer d'une façon satisfaisante le mécanisme pathogénique et immunitaire de l'infection charbonneuse.

Nous devons aujourd'hui nous borner à accepter cette vérité, affirmée récemment par A. Boquet et A. Saenz, à savoir que « l'immunité contre le charbon varie dans son mécanisme, selon les espèces animales ».

## SUR L'EXISTENCE DU PLOMB DANS LA TERRE ARABLE

par MM. GABRIEL BERTRAND et YÔNOSUKE OKADA.

Dans les conclusions d'un travail sur la présence normale du plomb dans l'organisme des animaux, publié avec V. Ciurea (1), l'un de nous a exprimé l'idée que l'on doit s'attendre à rencontrer le même métal dans les plantes et dans le sol. Partant de cette idée et désireux d'être fixés sur l'ordre de grandeur des proportions de plomb qui pourraient se trouver dans la couche arable, nous avons soumis de la terre, prélevée dans le jardin de l'Institut Pasteur, à de premiers essais : non seulement nous y avons reconnu l'existence du plomb de la manière la plus indiscutable, mais nous avons eu la surprise d'en rencontrer une proportion vraiment inattendue. La méthode suivante a été employée.

L'échantillon de terre, passée au tamis de 1 millimètre et pesant de 100 à 200 grammes, a été séché à l'étuve, à  $+ 100 - 105^{\circ}$ , puis calciné au four à moufle dans une capsule de porcelaine, en couche mince, à la température du rouge naissant. Le produit de la calcination a été additionné peu à peu d'acide chlorhydrique, jusqu'à cessation d'effervescence, puis de quelques centimètres cubes en excès de ce réactif et le tout chauffé à siccité au bain-marie, de manière à insolubiliser la plus grande partie de la silice. Le résidu a été délayé dans l'acide chlorhydrique concentré, étendu d'eau, chauffé jusqu'à ébullition, filtré et lavé à l'eau bouillante. On a saturé la solution acide par l'hydrogène sulfuré préalablement filtré à travers un tampon d'ouate. Après vingt-quatre heures de repos en vase fermé, le précipité noir a été recueilli, lavé avec une solution très légèrement acidulée par l'acide chlorhydrique et saturée d'hydrogène sulfuré, enfin séché et grillé dans une capsule de porcelaine.

Pour s'assurer de l'extraction complète des métaux précipi-

(1) *C. R. Ac. Sc.*, **192**, 1931, p. 990.

tables par l'hydrogène sulfuré, contenus dans la terre, le résidu indissous dans l'acide a été soumis à un ou deux nouveaux traitements semblables au premier. En général, il n'y avait plus visiblement de métal extractible après le deuxième traitement.

Les précipités sulfurés réunis ont été additionnés, après le grillage, d'un peu d'acide nitrique concentré et de quelques gouttes d'acide sulfurique. On a évaporé presque à sec, ajouté quelques centimètres cubes d'eau après refroidissement (environ 5 cent. cubes pour le produit de 100 grammes de terre), un volume double d'alcool à 95°, et l'on a abandonné le mélange à lui-même jusqu'au lendemain, dans la capsule couverte de manière à empêcher l'évaporation.

Le précipité a été séparé du liquide surnageant, qui contenait surtout le cuivre, lavé avec de l'alcool étendu de la moitié de son volume d'eau, séché et calciné, ainsi que le filtre. On avait fait attention à n'entraîner que le moins possible le précipité sur le filtre; on a brûlé celui-ci seulement au rouge naissant et l'on a traité les cendres par quelques gouttes d'acide nitrique et d'acide sulfurique avant la pesée.

Ce précipité contenait le plomb cherché à l'état de sulfate, mais il contenait aussi une certaine quantité de sulfates alcalino-terreux et une petite quantité de silice. Pour le purifier, on l'a traité à plusieurs reprises par une solution d'acétate d'ammoniac à 20 p. 100, jusqu'à ce que la solution filtrée cesse de donner la moindre réaction par l'hydrogène sulfuré. Les nouveaux précipités, obtenus et recueillis de la même manière que les précédents, ont été réunis, grillés et convertis à leur tour en sulfate par chauffage avec quelques gouttes d'acides nitrique et sulfurique. On a obtenu ainsi un sel de plomb pratiquement pur dont la pesée a mis fin au dosage.

Bien que les réactions utilisées dans les traitements ci-dessus soient déjà très caractéristiques, nous avons tenu à compléter l'identification du précipité recueilli en fin d'analyse en le réduisant au chalumeau pour en extraire le métal; on l'a mélangé pour cela avec du carbonate de sodium et un peu de cyanure de potassium, puis chauffé sur le charbon au feu réducteur; on a obtenu, après broyage au mortier d'agate de la masse fondue et refroidie, des globules de plomb aisément



reconnaissables à leur couleur, à leur malléabilité et à leur conversion en litharge lorsqu'on les chauffait au feu oxydant sur une petite cupule de cendre d'os.

Nous avons opéré sur deux prélèvements : l'un d'environ 200 grammes, qui a été analysé tout entier, et l'autre d'environ 1 kilogramme, sur lequel on a pris plusieurs échantillons. Voici les chiffres recueillis au cours de ces diverses expériences :

	POIDS des échantillons séchés en grammes	POIDS après calcination en grammes	SO <sup>4</sup> Pb PESÉ en grammes	PLOMB TROUVÉ	
				dans un échantillon en milligr.	per kilo de terre sèche en grammes
Premier prélèvement . . .	178,6	144,7	0,0682	46,6	0,261
Deuxième prélèvement . . .	184,7	141,0	0,0561	38,3	0,207
Deuxième prélèvement . . .	189,7	144,8	0,0638	43,6	0,230
Deuxième prélèvement . . .	165,6	126,5	0,0544	37,0	0,223
Deuxième prélèvement . . .	113,6	86,7	0,0377	26,7	0,227

On remarquera que tous les réactifs dont nous nous sommes servis pour l'extraction et la précipitation du plomb sont volatils, par conséquent, faciles à obtenir purs. Nous les avons préparés nous-mêmes par distillation au laboratoire (1). D'ailleurs, la méthode employée, comportant des extractions à blanc, prouve que le plomb n'a pu être apporté ni par les capsules de porcelaine, ni par les réactifs. On doit donc conclure que la terre analysée renfermait réellement du plomb. La proportion en est relativement élevée, puisqu'elle atteint près de 1/4 de gramme par kilogramme de terre sèche.

(1) L'eau distillée du commerce renferme souvent du plomb et d'autres métaux provenant du serpentín en cuivre étamé qui a servi à la condensation. Nous n'avons employé que de l'eau redistillée dans le vide à l'aide d'un appareil de verre.

## RECHERCHES SUR LA NUTRITION DES TRYPANOSOMIDES.

par MARGUERITE LWOFF.

*(Laboratoire de Protistologie. Institut Pasteur, Paris.)*

En quoi la nutrition des Trypanosomides, Protozoaires parasites, diffère-t-elle de la nutrition des Protozoaires libres ? tel est le problème que je me suis proposé de résoudre. Ces recherches ont eu pour point de départ les travaux de A. Lwoff sur le pouvoir de synthèse des Protozoaires *s. s.* qui ont besoin, pour effectuer leur croissance et leur multiplication, des produits de l'hydrolyse pepsique ou trypsique ménagée des protides, condition définie par le terme de « métatrophie ».

Il s'agissait de déterminer la ou les substances qui, en plus des aliments nécessaires aux métatrophes, sont indispensables aux Trypanosomides. Sans anticiper sur les conclusions de ce travail, je tiens à indiquer dès maintenant que j'ai pu démontrer l'existence, parmi les Trypanosomides, d'une espèce ne différant pas physiologiquement des métatrophes ; que cependant la grande majorité d'entre eux diffèrent des métatrophes par le besoin d'une certaine quantité de sang, variable suivant les organismes ; que la substance indispensable du sang est l'hématine et que l'activité de l'hématine est liée au fer qu'elle contient.

### I. — Historique.

On ne trouvera pas ici un exposé détaillé et chronologique de tous les milieux qui ont été successivement imaginés et utilisés pour la culture des Trypanosomides. Seuls, les plus importants d'entre eux seront retenus : ceux qui sont restés les types des milieux usuels. Tous ceux-ci, sans exception, sont

dérivés de deux principaux, l'un solide, la gélose au sang de Novy et Mac Neal (1903), l'autre liquide, le bouillon-sang de Miyajima (1907). Toutes les formules établies depuis ne sont, à peu de chose près, que des modifications plus ou moins heureuses du bouillon-sang ou de la gélose de Novy et Mac Neal. Le dessein des auteurs a presque toujours été, en effet, d'obtenir des milieux de plus en plus favorables à la culture d'espèces données, c'est-à-dire d'obtenir des cultures le plus possible rapides et abondantes, mais non d'analyser, en étudiant les constituants indispensables à la culture de ces espèces, la physiologie de leur nutrition.

Le travail relativement récent de G. Zotta (1923), le premier en date qui traite un peu longuement de cette physiologie, occupera une place toute particulière dans l'exposé bibliographique.

Tous les milieux sont classés, énumérés et décrits dans le mémoire de Nöller : *Die Züchtung der parasitischen Protozoen* (1928). On devra s'y rapporter pour les détails. Je donne ici plus une vue d'ensemble rapide et synthétique qu'un exposé analytique, exposé qui existe déjà dans le travail cité de W. Nöller.

La gélose au sang, le milieu solide le plus communément utilisé, a d'abord été [Novy et Mac Neal, 1903] (1) un mélange de gélose bactériologique ordinaire et de sang de lapin prélevé aseptiquement. Novy et Mac Neal la modifient peu après pour la culture du Trypanosome du rat, remplaçant le sang de lapin par du sang de rat, et ajoutant du glycocolle et de l'asparaginate de sodium. Charles Nicolle (1908) simplifie la formule de la gélose de Novy et Mac Neal (gélose N. N.). Il supprime la peptone et l'extrait ou la macération de viande, et la gélose de Ch. Nicolle (gélose N. N. N.) est alors un simple mélange d'agar salé et de sang.

Il n'y a presque rien à retenir, au point de vue de la nutrition, des modifications apportées par la suite à la formule N. N. N. Elle a été adaptée selon les exigences des espèces étudiées. Notamment, on y a ajouté souvent différents glu-

(1) La gélose au sang était déjà connue des bactériologistes (Pfeiffer, 1892-1893; Voges, 1894, etc.).

cides : ainsi Bayon (1912), pour *Trypanosoma rhodesiense*, Hagemeister (1914), incorporent du glucose à la gélose N. N. N. De même W. Nöller, un peu plus tard (1917), pour la culture de nombreuses espèces. Mathis (1906), pour simplifier la préparation, chauffe le milieu en totalité (gélose + sang). On reviendra plus longuement sur ce procédé et son intérêt théorique. On peut encore ajouter à cette liste : la gélose N. N. N. alcaline de Laveran et Franchini (1919), la gélose « tamponnée » de Young et Van Sant (1923), la gélose hypotonique de Ponselle (1913) pour certains Trypanosomes de poissons et de batraciens, la gélose de Yoschida (1918) au sang de cheval. Dans tous ces milieux, la culture se produit en partie dans l'eau de condensation de la gélose, en partie à la surface de la gélose.

Dans toute une série de recherches, W. Nöller (1917 à 1923) expose de nouvelles méthodes d'isolement. Il montre que, cultivés sur plaques de gélose sucrée au sang (Traubenzuckerpferdeblutplattenagar), les divers Trypanosomides — surtout les Leptomonas — s'y organisent en colonies orientées dont les dessins sont caractéristiques des espèces. Nöller parvient ainsi à préciser bien des points des conditions de culture des Trypanosomides : température optima, concentration du milieu, influence des divers glucides...

Les milieux liquides dérivent, pour la plupart, du bouillon-sang de Miyajima (1907) — Irikura (1907-1908) : deux à dix parties de sang défibriné de cheval, par exemple — ou de bœuf pour le trypanosome du bœuf, ou de mouton pour le trypanosome du mouton, — dans dix parties de bouillon nutritif ordinaire. On peut inactiver au bain-marie à 56°. Laveran et Pettit (1910) suppriment la macération de viande du bouillon et se servent, pour la culture des leishmanies, d'une eau peptonée additionnée de sang.

Dans le milieu de Row (1912), une partie de sang défibriné de lapin est hémolysée dans huit à dix parties d'eau distillée ; on y ajoute 8 p. 100 environ de NaCl. Récemment (1930), Row a incorporé de la gélose à son milieu liquide, reproduisant ainsi la formule N. N. N. qui lui a donné de meilleurs résultats que celui-ci.

Pensant que l'hypertonie des milieux pouvait avoir un rôle empêchant, Ponselle (1923) établit les formules des milieux



hypotoniques. Il semblerait qu'à chaque organisme dût correspondre une concentration optima en NaCl.

Enfin, le milieu de Noguchi et le milieu de Wenyon sont semi-solides. Suffisamment fluides pour permettre les repiquages à la pipette, ils conservent (gélose à 2 p. 4.000 environ) une certaine viscosité qui paraît indispensable, notamment aux leishmanies. Le sang, qui s'y trouve en quantité importante, est introduit, soit en deux fois, sérum et hématies séparés (Noguchi); soit en une seule fois (Wenyon) : sang total non défibriné, prélevé à l'oreille du lapin et qu'on introduit directement en le laissant tomber de l'oreille paraffinée dans les tubes.

Les milieux aux organes stérilisés sont aussi des milieux liquides. Ils ont été établis par Chatton (1918) pour la culture pure du *Trichomastix* du gecko. Chatton a utilisé d'abord des fragments d'organes en autolyse aseptique dans du bouillon nutritif, puis les a stérilisés par chauffage. Zotta (1923) a obtenu avec ces milieux d'excellents résultats pour la culture de *Leptomonas pyrrhocris*. Les milieux aux organes stérilisés par la chaleur contiennent évidemment une certaine quantité de sang chauffé.

Il est inutile d'allonger encore cette liste. On voit que si l'on a établi un très grand nombre de milieux favorables à la culture des Trypanosomides on s'est peu préoccupé de préciser leurs besoins nutritifs.

Pour la première fois, en 1923, le problème de la culture est posé d'une façon différente de ce qu'on avait fait jusqu'alors. G. Zotta, cherchant à déterminer les conditions les plus favorables à la culture de *Leptomonas pyrrhocris*, parasite du tube digestif de l'hémiptère *Pyrrhocris apterus*, se place, non comme ses prédécesseurs, au point de vue du simple déterminisme de la production de cultures, mais des facteurs indispensables à la nutrition du flagellé. Zotta cherche d'abord à établir le plus grand nombre possible de milieux variés en faisant une place à part à ceux qui permettent la culture indéfinie de *Leptomonas pyrrhocris*. Il met nettement en évidence que, pour un *Leptomonas* donné, les milieux se répartissent en trois catégories : ceux dans lesquels toute culture échoue d'emblée, ceux où elle est possible pendant quelques passages

grâce à des circonstances fortuites (sur lesquelles d'ailleurs on reviendra au cours de ce travail), ceux enfin où la culture est indéfinie. Dans le cas de *Leptomonas pyrrhocoris*, se placent dans le premier groupe : le sérum normal de cheval, le sérum chauffé de cheval, le sérum coagulé; dans le deuxième : la gélose ordinaire, la gélose lactosée, l'eau peptonée, le bouillon ordinaire; dans le troisième enfin, le lait stérilisé, le bouillon-lait, le bouillon-ascite, le bouillon-sang, les milieux aux organes stérilisés, les milieux aux extraits frais d'organes (extrait de la chenille *Galleria mellonella*, Lépidoptère), les milieux à la « catalase du foie de veau ». En ce qui concerne les milieux de ce troisième groupe — qui permettent la culture indéfinie — Zotta attire l'attention sur le fait qu'ils comprennent deux parties bien distinctes : d'une part le milieu proprement dit, bouillon nutritif par exemple, et, d'autre part, les substances à action « favorisante », qui, en réalité, sont indispensables (sang, lait, « catalase »).

C'est ainsi qu'il étudie dans quelles conditions le sang, ajouté au bouillon peptoné, détermine l'apparition des cultures de *Leptomonas pyrrhocoris*. Il montre qu'il ne se produit pas de culture indéfinie dans le bouillon ordinaire, mais qu'un apport relativement peu élevé de sang défibriné de lapin, 1/5.000, est suffisant pour déclancher l'apparition d'une culture. Il est amené à chercher à remplacer le sang par des extraits d'organes divers et, après avoir constaté que les milieux aux organes (foie, rate, etc.) coagulés par la chaleur donnent de bons résultats, ainsi qu'un extrait total de chenilles de *Galleria mellonella*, il étudie l'action favorisante d'une « catalase » extraite du foie de veau (1). Il mène, avec cette catalase, des expériences parallèles à celles qu'il a faites avec le sang total et peut déterminer avec précision la dose minima indispensable. Elle est de 1/43.000 et la densité de la culture est de 860 individus par millimètre cube. Zotta a donc parfaitement compris l'importance des « facteurs de croissance » pour les *Leptomonas* : « En réalité, en dehors des milieux au lait et aux organes stérilisés où les

(1) Cette catalase, comme celle du foie de cheval (Zeile et Hellstrom, 1931) doit être un complexe porphyrine-fer.

leptomonades peuvent se multiplier sans l'intervention de facteurs adjuvants, tous les autres milieux, employés seuls, ne sont pas favorables à la croissance active et indéfinie de ces organismes: et, pour que ces milieux puissent devenir propres à leur multiplication, ils doivent être activés par certaines substances. Une de celles-ci est le sang qui, ajouté aux liquides nutritifs, rend possible la croissance des protozoaires » (p. 79).

Zotta a comparé les actions similaires du sang et de la catalase du foie de veau et il a été amené à penser que le sang agit grâce à son pouvoir « catalasique » (1). Il ne manque pas non plus de rapprocher ce qui se produit chez les Trypanosomides avec ce que l'on sait des cultures de bactéries parasites hémophiles, et il pressent l'intérêt d'un tel rapprochement : « L'action nettement favorisante du sang défibriné de mammifères sur le développement des Leptomonades (et des Trypanosomides en général) en culture impose un rapprochement — au point de vue physiologique — de ces organismes des bactéries hémophiles et il serait peut-être utile d'étudier de plus près les détails de cette hémophilie » (p. 81).

Toujours par analogie avec ce qui se passe pour les bactéries hémophiles, Zotta pose enfin, mais sans la résoudre, la question de la nécessité, pour les Leptomonades, d'un facteur vitaminique.

On voit donc clairement ce que l'on doit à Zotta au point de vue du problème de la nutrition des Trypanosomides. Il a su dégager la nécessité de deux facteurs bien différents : le milieu nutritif proprement dit, d'une part, et, d'autre part, une substance agissant à faible dose et contenue dans le sang, les organes, la « catalase » du foie de veau, substance non détruite par chauffage à 120° à l'autoclave; il a rapproché ces faits de ceux connus chez les bactéries hémophiles. Surtout Zotta a été le premier à envisager la question des cultures de Trypanosomides non pas du point de vue purement pratique de l'obtention des cultures, mais de celui, plus intéressant, de la nutrition des *Leptomonas* et des substances indispensables qui les caractérisent.

Depuis, Salle et Schmidt (1928), puis Salle (1931) ont ana-

(1) Zotta emploie le mot « catalytique »; c'est là évidemment un lapsus.

lysé la nutrition de *Leishmania donovani*. Ils ont, d'une part, étudié le métabolisme azoté de ce Trypanosomide en culture, puis tenté d'étudier le rôle de l'hémoglobine. Ils sont parvenus à remplacer l'hémoglobine des globules sanguins par une préparation d'hémoglobine cristallisée. Mais ils n'ont pas poussé plus loin leurs investigations dans ce sens. Leurs résultats étendent ceux de Zotta et confirment les miens.

Depuis quelques années (1928 à 1932), j'ai moi-même publié dans une suite de notes préliminaires les résultats partiels que j'ai obtenus avec différents *Leptomonas*. Envisageant le problème proprement dit de la nutrition, j'ai pu établir les besoins minima des trois espèces étudiées : *Leptomonas ctenocephali*, parasite de *Ctenocephalus canis*, *Leptomonas* (*Strigomonas*) *fasciculata*, parasite de *Culex* et d'*Anopheles*, *Leptomonas* (*Strigomonas*) *oncopelti*, parasite d'Euphorbes et de *Lygæus*. Le rôle du sang a été précisé. La nature de l'élément indispensable qu'il contient a été recherchée aussi précisément que possible et ces résultats ont amené à une fructueuse comparaison entre la physiologie de la nutrition des Flagellés parasites, d'une part, et celle des Bactéries hémophiles; celle-ci constitue, on le sait, un chapitre intéressant, non encore parfaitement élucidé, de la physiologie bactérienne.

\*  
\* \*

La plupart des travaux antérieurs aux miens sont cités au cours de ce mémoire, au fur et à mesure des besoins de l'exposé.

## II. — Matériel et méthodes.

### 1. — LES SOUCHES.

1° *Leptomonas ctenocephali*, parasite du tube digestif de la puce du chien, *Ctenocephalus canis*. Ce *Leptomonas* a fait l'objet de nombreuses recherches en raison de l'intérêt qu'il a suscité à cause de son habitat dans la puce du chien. Certains auteurs ont cru pouvoir l'identifier à une forme d'évolution de *Leishmania infantum*, point de vue depuis longtemps abandonné.



Décrit pour la première fois par Fantham en 1912, qui le trouva en Angleterre chez les puces d'un chien ne présentant ni Trypanosomes ni Leishmanies, il fut cultivé d'abord par W. Nöller (1914), puis par de nombreux chercheurs. Les milieux qui lui sont favorables sont l'eau de condensation de la gélose sucrée au sang de cheval (Nöller, 1914, 1917), la gélose N. N. N. (Laveran et Franchini, 1919, Chatton, 1919, Tyzzer et Walker, 1919), la gélose en plaque de Nöller. D'après Franchini (1923), le latex ne permettrait pas, comme le sang, sa culture. Drbohlav (1925) cherche à déterminer l'élément du sang indispensable et, conduit à la conclusion qu'il se trouve dans les hématies, cherche à remplacer celles-ci par l'hémoglobine du commerce, mais sans succès. Il détermine la réaction du milieu la plus favorable : elle serait pour  $pH = 6,8$ . L'action favorisante du glucose observée dans certains milieux ne serait due qu'à la légère acidification qui se produit dans les milieux glucosés après stérilisation. Drbohlav cherche enfin à stabiliser la réaction du milieu N. N. N. en y introduisant du biphosphate de sodium qui joue le rôle de tampon. La température la plus favorable est aux environs de  $25^{\circ}$ , mais de  $22^{\circ}$  à  $30^{\circ}$  on obtient facilement d'excellents résultats.

Les cultures peuvent se maintenir très longtemps, jusqu'à vingt-deux mois (Nöller) sans repiquage, en tubes paraffinés.

En résumé, *Leptomonas ctenocephali* est facile à cultiver dans les milieux au sang usuels. Le sang lui est indispensable. Aucune précision n'est connue relativement à sa nutrition.

La souche avec laquelle j'ai expérimenté a été isolée par Chatton, en 1919, à partir de l'ampoule rectale de *Ctenocephalus canis* où les flagellés se trouvaient en abondance sous la forme grégarinienne. D'après Chatton, la culture pure a été obtenue assez facilement par lavage de l'ampoule rectale en eau physiologique stérile. Les subcultures aussi ont été faciles. L'isolement fut fait en eau de condensation de la gélose N. N. N. En 1920, Laveran et Franchini ont créé, pour le flagellé isolé par Chatton, la variété *chattoni* Laveran et Franchini 1920.

La morphologie et la cytologie de ce *Leptomonas* ont été précisées par A. et M. Lwoff (1929, 1930, 1931). En culture, *L. ctenocephali* se présente sous deux catégories de formes : grégariniennes et monadiennes. On trouve tous les stades de

transition du passage d'une forme à l'autre par allongement du corps et poussée à l'extérieur du flagelle, ou régression du flagelle qui se transforme en mèche muqueuse avec passage de la forme aciculée à la forme sphérique. Les formes grégariennes sont les plus fréquentes dans les cultures jeunes en voie de multiplication intense. Les monadiens se font plus nombreux par la suite, quand la culture est d'âge moyen ou vieillie. *Leptomonas ctenocephali* forme de nombreuses rosaces de grégariens et de monadiens.

Au point de vue cytologique, A. et M. Lwoff ont mis en évidence, chez ce Flagellé, un appareil parabasal comprenant deux parties très distinctes : un anneau périflagellaire, dérivé centrosomien qui existe chez toutes les formes grégariennes et monadiennes ; un filament, fixé sur cet anneau, non permanent, qui subit un cycle parallèle au cycle morphologique : il se forme à partir de l'anneau au moment de la transformation des grégariens en monadiens, est complètement développé chez les monadiens, puis dégénère.

Telles sont, rapidement énumérées, les caractéristiques de la souche de *Leptomonas ctenocephali* étudiée.

2° *Leptomonas (Strigomonas) fasciculata*. — Parasite du tube digestif des Moustiques (*Culex*, *Theobaldia*, *Anopheles*). Il fut isolé pour la première fois en culture, mixte d'abord, par Novy et Mac Neal (1905), puis pure par Novy et Knapp (1906) et décrit par Novy, Mac Neal et Torrey (1907). Il a été cultivé par Fraenkel (1909), Mesnil (1912), Nöller (1917). Schulz (1923-1924) a étudié le noyau et la mitose.

L'isolement a été fait par Novy et Knapp en eau de condensation de gélose au sang, mais plus tard, tous les chercheurs qui eurent à entretenir *Leptomonas fasciculata* ont reconnu que sa culture est possible sur gélose et en bouillon nutritifs ordinaires.

La souche avec laquelle j'ai expérimenté est celle isolée par Nöller en 1917 de l'intestin postérieur de *Culex pipiens*. Quand je l'ai reçue elle était au cent treizième passage et Nöller l'entretenait depuis longtemps, je crois, en bouillon ordinaire.

Les particularités morphologiques de *L. fasciculata* sont exposées plus loin en même temps que celles de *L. oncopelti*.

3° *Leptomonas* (*Strigomonas*) *oncopelti*. — Décrit en 1926 par Noguchi et Tilden. Isolé par eux de diverses plantes à latex, les Asclépiadées : *Asclepias syriaca*, *Asclepias nivea*, et retrouvé chez l'Hémiptère *Lygæus kalmii*. Noguchi et Tilden l'ont cultivé dans le milieu semi-solide de Noguchi pour *Leptospires*.

Noguchi et Tilden ont fait des observations sur la morphologie de ce *Leptomonas* et quelques expériences se rapportant surtout à la réaction du milieu. Ils ont vu que *Leptomonas oncopelti*, le plus souvent, en culture, présente des formes trapues, tronquées ; dans la plante, il y aurait une plus forte proportion d'aciculés que dans les cultures. *Leptomonas oncopelti* peut se multiplier dans des milieux très acides ( $pH$  aux environs de 4).

M. et A. Lwoff (1931) ont donné des précisions sur la morphologie de *L. oncopelti*. Ils ont montré, en particulier, qu'il se rapproche morphologiquement beaucoup de *L. fasciculata* du *Culex*. Ces deux Trypanosomides possèdent en commun plusieurs caractères qui leur font une place à part dans le groupe : 1° un système de stries longitudinales non assimilables à des myonèmes ; 2° l'extrémité antérieure tronquée en plateau ou invaginée en une cupule qui n'a pas la valeur d'un cytopharynx ; 3° des grégariens possédant toujours un flagelle libre. Leur fixation au substratum est assurée par le bord du plateau ou de la cupule ; pour les distinguer des grégariens *sensu stricto*, on peut les appeler « pseudo-grégariens » ; 4° le flagelle n'est jamais accompagné d'une lame cytoplasmique.

En raison de cet ensemble de caractères, M. et A. Lwoff ont créé le sous-genre *Strigomonas* (du genre *Leptomonas*), comprenant deux espèces : *Strigomonas fasciculata* et *Strigomonas oncopelti*.

J. G. Thomson et N. Robertson (1932), qui ont entre les mains les souches isolées par Noguchi et Tilden, ont fait remarquer, à propos de *Herpetomonas culicidarum* qui est très voisin de *Strigomonas fasciculata*, sinon identique à lui, que ce flagellé présente un autre caractère différentiel, à savoir l'orientation des mouvements du flagelle. Ils estiment aussi que les caractères spéciaux de ces *Leptomonas* justifient la création non d'un sous-genre, mais d'un genre. Je suis complètement

en accord avec Thomson et Robertson sur tous ces points.

Il me faut ajouter enfin que la souche de Noguchi et Tilden m'a été transmise par C. M. Wenyon au mois de mars 1930. Elle était entretenue en milieu de Wenyon. Depuis cette date, elle est entretenue en eau peptonée.

Au cours de ce travail, les deux Trypanosomides dont il vient d'être parlé seront toujours désignés sous le nom de *Strigomonas fasciculata* et *Strigomonas oncopelti*.

## 2. — LES MILIEUX.

1° GÉNÉRALITÉS. — Il n'est pas utile d'insister ici sur le fait que toutes les expériences ont été faites avec des cultures bactériologiquement pures et qu'aucune précaution pour s'assurer périodiquement de leur pureté n'a été négligée.

Toutes les expériences ont été faites en milieu liquide. Comme il s'agissait avant tout d'étudier le pouvoir actif, à faibles doses, de certaines substances, il fallait d'abord choisir un milieu de base non suspect de renfermer même une partie minime de ces substances. Le bouillon nutritif ordinaire a été éliminé à cause de la complexité de sa composition. Il contient en outre une assez forte quantité d'hématine, ce qui peut, on le verra plus loin, fausser les résultats quand on expérimente avec des organismes assez sensibles.

C'est une eau peptonée qui a servi de milieu de base. Sa composition est la suivante :

Peptone . . . . .	20
NaCl . . . . .	6
Eau redistillée . . . . .	1.000

On ajuste à  $pH = 7,00 - 7,2$ . On précipite les phosphates par chauffage, vingt minutes à  $120^\circ$ , à l'autoclave. On filtre et on répartit en tubes. Stérilisation.

La peptone utilisée fut d'abord la peptone Chapoteaut, puis la peptone pepsique de bœuf (Vaillant), puis la peptone pepsique d'arachide (Vaillant).

A ce milieu peptoné, on ajoute les substances dont on veut étudier le rôle nutritif. Toutes les dilutions ont été faites à la pipette graduée (stérile, naturellement).



Toutes les expériences ont été faites dans de la verrerie Pyrex. On a toujours utilisé de l'eau redistillée dans un appareil en verre Pyrex.

Expériences effectuées à 20-22°. La température optimale est  $28 \pm 1^\circ$  : c'est à cette température que les cultures sont le plus rapides.

En ce qui concerne l'examen des résultats, il convient de faire remarquer dès maintenant qu'il ne faut jamais se contenter de ceux des premiers passages. Quand on étudie en effet des substances qui agissent à des doses très faibles, comme ce sera ici le plus souvent le cas, on peut faire des erreurs considérables si on ne tient compte que des premiers passages : on apporte lors du premier ensemencement, en même temps que les organismes, les éléments indispensables en quantité suffisante pour assurer un développement pendant un, deux ou même trois passages. On devra, naturellement, varier les exigences suivant la physiologie de l'organisme étudié : un deuxième passage en eau peptonée plus hématine, par exemple, est plus significatif pour *Leptomonas ctenocephali* qu'un quatrième ou cinquième pour *Strigomonas fasciculata* dans le même milieu.

J'aurai l'occasion de revenir sur ce point, à propos de la discussion d'expériences personnelles ou de la critique des résultats de quelques auteurs.

Pour la lecture des résultats, quelques chiffres fixeront les idées. Dans une culture en voile, on a généralement de 600.000 à 800.000 individus par millimètre cube, mais souvent beaucoup plus. Dans une culture en anneau, 300 à 600.000 ; cela s'entend si l'on prélève le voile ou l'anneau. Dans une bonne culture (+) sans voile ni anneau : 15 à 50.000 par millimètre cube, 3 à 5.000 individus par millimètre cube représentent une culture pauvre et moins de 500 une culture très pauvre.

2° MILIEUX D'ENTRETIEN. — Avant d'exposer en détail la nutrition proprement dite des Trypanosomides étudiés dans ce travail, il me paraît utile de donner la liste des milieux qui permettent leur culture indéfinie, tout en étant de préparation facile et rapide. Chaque *Leptomonas* sera envisagé séparément.

Pour chacun, un ou au plus deux milieux seront indiqués. Le choix ayant été effectué entre de nombreuses formules, on peut être certain de la supériorité de celles qui ont été retenues.

*Strigomonas oncopelti*. — Tous les milieux pour les Trypanosomides lui conviennent; je ne m'y arrêterai pas. Mais le milieu de choix pour *Strigomonas oncopelti* est la solution peptonée (sans addition de sang) dont la formule suit :

Peptone (pepsique pancréatique animale ou végétale) (1).	20
NaCl. . . . .	6
Eau redistillée. . . . .	1.000

*Strigomonas oncopelti* se multiplie parfaitement dans des milieux de  $pH = 4$  à 8. On peut donc ajuster vers 6,5 par exemple. Si l'on ensemence 8 à 10 cent. cubes de ce milieu avec une partie d'une culture en voile, on obtient une culture riche, à 22°, en trois à cinq jours (culture en anneau). Un voile épais est constitué soit un ou deux jours après l'apparition de l'anneau, soit en même temps. Il se maintient en moyenne de six semaines à deux mois, mais souvent plus, trois, quatre, cinq, et même six mois. Il est difficile de dire combien de temps peut durer une culture dans un tube. A un mois près, ce temps est très variable; c'est pourquoi il est prudent de ne pas attendre plus de quarante à quarante-cinq jours pour repiquer *Strigomonas oncopelti* en eau peptonée. Il est avantageux de faire des ensemencements le plus faibles possible, avec l'anse de platine par exemple.

*Strigomonas fasciculata*. — On a le choix entre deux milieux :

1° Solution peptonée + une très petite quantité de sang (1 goutte pour 10 cent. cubes);

2° Milieu aux organes stérilisés (2).

Dans l'eau peptonée + sang, on obtient des résultats excellents. Pour la marche des cultures, on peut se rapporter à ce qui a été dit plus haut pour *Strigomonas oncopelti*. Les résultats

(1) Pour le choix de la peptone, voir le paragraphe « Nutrition azotée ».

(2) Ceux-ci pourraient aussi servir de milieu d'entretien pour *Strigomonas oncopelti*, mais ils n'ont pas été mentionnés comme n'offrant pas, pour ce *Leptomonas*, d'avantage évident sur l'eau peptonée.

sont tout à fait semblables : il serait superflu d'y revenir. Repiquer par précaution tous les quarante-cinq jours environ, avec surveillance échelonnée des cultures (1).

Les milieux aux organes stérilisés sont extrêmement pratiques.

Je rappelle la composition qui a été déjà donnée par G. Zotta, A. Lwoff : Par tube, 1/2 à 1 cent. cube d'organe de lapin (foie, cerveau) dans 8 à 10 cent. cubes d'eau distillée, le tout stérilisé vingt minutes à 113°. Les cultures y sont rapides, abondantes et durables : six à huit mois sans capuchonnage. Ces milieux ont l'avantage d'être faciles à préparer, rapides à obtenir ; ils permettent de très longues cultures (2).

*Leptomonas ctenocephali*. — Le milieu d'entretien est l'eau peptonée additionnée de sang : 10 à 15 gouttes de sang défibriné dans 8 à 10 cent. cubes d'eau peptonée. Les cultures commencent à apparaître sous forme de petites rosaces collées au verre, progressant de bas en haut, quinze à dix-huit jours après l'ensemencement, à 20-22°. Puis, la densité en flagellés croît rapidement, il se forme un anneau, puis un voile (vingt-cinquième jour environ). Il est prudent de repiquer toutes les quatre à cinq semaines. On observe des cultures qui durent jusqu'à trois ou quatre mois.

En résumé, pour *Strigomonas oncopelti* : l'eau peptonée ;

pour *Strigomonas fasciculata* : 1° l'eau peptonée + sang (I goutte pour 10 cent. cubes) ; 2° les milieux aux organes stérilisés ;

pour *Leptomonas ctenocephali*, l'eau peptonée + sang (X gouttes pour 10 cent. cubes),  
sont les milieux de choix pour l'entretien des souches.

3° REMARQUES SUR QUELQUES MILIEUX. — *Leptomonas ctenocephali* et les milieux aux organes stérilisés. — Les milieux aux organes stérilisés qui sont si pratiques pour entretenir les

(1) Remarquons qu'on peut essayer d'entretenir *Strigomonas fasciculata* en bouillon ordinaire. Plusieurs chercheurs l'ont fait (Fraenkel, Nöller). Je n'ai moi-même jamais pu parvenir à effectuer dans ce milieu plus de sept à huit passages. Les résultats sont donc aléatoires.

(2) A. Lwoff signale qu'il a observé dans ces milieux des cultures en excellent état de *Glaucoma piriformis* (cilié) en tube capuchonné quatre ans après l'ensemencement. Je n'ai jamais capuchonné les milieux.

souches de beaucoup de Protozoaires : *Trichomastix*, du gecko (Chatton); *Leptomonas pyrrocoris* (Zolta); *Glaucoma piriformis* (A. Lwoff); *Strigomonas oncopelti* et *Strigomonas fasciculata*, n'offrent pas de réel intérêt pour la culture de *Leptomonas ctenocephali*. En effet, obtenus en stérilisant un fragment d'organe, soit dans l'eau distillée, soit dans l'eau physiologique, ils sont toujours acides. On sait que *Leptomonas ctenocephali* peut être cultivé dans des milieux dont le  $pH$  est moindre de 6,8, ainsi que l'a signalé Drbohlav (1925), et que je l'ai moi-même constaté.

Comme il faut amener le milieu à  $pH = 7,00 - 7,2$  environ, une partie de l'intérêt des milieux aux organes s'en trouve donc supprimée; leur préparation devient aussi compliquée que celle des autres milieux pour des résultats qui, en définitive, ne sont pas meilleurs.

Voici, à titre d'indication, les résultats qu'on obtient quand la réaction du milieu est favorable :

*Cerveau* : Culture rapide, six à sept jours. Trouble visible, le septième jour. Trouble épais, vers le dix, douzième jour. Anneau, vers le quinzième jour. Culture repiquable, du dix au centième jour environ.

*Rein et rate* : Comme avec le cerveau.

*Foie* : Apparition de la culture, quatre à six jours. Trouble appréciable, dix jours. Trouble épais, douze à quinze jours. Culture repiquable de douze jours à plusieurs mois. Une culture du 6 décembre 1927, encore en bon état le 22 juin 1928, et repiquée à cette date, a donné une culture positive normale; cette durée de plus de sept mois a été le maximum observé (température :  $22^{\circ}$ ).

Milieux au sang chauffé : C'est Mathis (1906 et 1911) qui a utilisé les milieux au sang chauffé dans le dessein pratique de simplifier la préparation des milieux de culture et d'éviter les temps délicats de la ponction aseptique du cœur ou de la carotide du lapin et de la répartition aseptique du sang dans les tubes (1). La stérilisation du milieu total limite ces chances de contamination. On peut utiliser soit le chauffage discontinu, trois fois une heure à  $75^{\circ}$  ou  $100^{\circ}$  avec des intervalles de vingt-

(1) Les milieux au sang chauffé étaient depuis longtemps connus des bactériologistes qui expérimentaient sur le bacille de Pfeiffer.



quatre heures pendant lesquels les tubes sont portés à l'étuve à 37°, soit le chauffage en une fois vingt minutes à 120°. Mathis a expérimenté avec la gélose N. N. N. Il y a obtenu des cultures de *Trypanosoma rotatorium*, *Tr. lewisi*, *Leishmania infantum*, *Leishmania tropica*.

J'ai moi-même fait des expériences analogues avec l'eau peptonée-sang sur *Leptomonas ctenocephali*. Dans 8 cent. cubes d'eau peptonée on ajoute X gouttes environ de sang défibriné de lapin. C'est une proportion qui, avec le sang frais, donne à coup sûr des cultures riches; la comparaison est donc facile. Une partie des tubes sont chauffés à 70°, d'autres à 95°, d'autres enfin à 120°. Chaque série comprend 8 à 10 tubes. Lesensemencements sont faits avec II, III gouttes d'une culture très riche en peptone-sang frais. Les résultats ont été les suivants :

1° A 70° : culture en sept à huit jours; voile du douzième au dix-huitième jour. Repiquages faciles. Flagellés encore vivaces vers le trente-cinquième jour. Mêmes résultats au cinquième passage.

2° A 95° : culture en six à huit jours; voile du douzième au seizième jour. Pour le reste, mêmes résultats qu'à 70°.

3° A 120° : culture vers le dixième jour; voile du dix-septième au vingt-sixième jour. Flagellés vivants le quarantième jour. A tous les stades, culture facilement repiquable. Mêmes résultats au cinquième passage.

Si on hémolyse le sang avant de l'introduire dans l'eau peptonée, puis qu'on chauffe le tout, on obtient des résultats analogues. Mais souvent il ne se forme pas de voile.

Des expériences en eau physiologique ont été conduites de façon tout à fait analogue. Il n'y a pas lieu de s'appesantir ici sur les détails de ces expériences. Elles ont montré que l'entretien de *Leptomonas ctenocephali* n'est pas possible en eau physiologique + sang chauffé, les cultures y étant relativement peu abondantes et surtout ne durant pas longtemps (1).

*Strigomonas fasciculata* et *Str. oncopelti* se multiplient très bien dans tous ces milieux.

Une seule chose est importante à retenir ici : le chauffage,

(1) Voir pour plus de détails M. Lwoff, 1929.

même élevé (120°) et prolongé (vingt minutes), ne détruit pas le pouvoir activant du sang. C'est la conclusion importante qu'on doit tirer de l'étude de ces milieux au sang chauffé qui n'ont pas, par ailleurs, un grand intérêt.

### III. — La nutrition azotée.

L'étude de la nutrition azotée des Trypanosomides est compliquée par la nécessité, pour la plupart d'entre eux, de la présence de sang dans les milieux de culture. Si, en effet, le sang est présent dans les milieux en proportion assez forte, il peut lui-même apporter les substances azotées suffisantes; c'est ce qui se produit dans certains des milieux d'entretien préconisés : milieu de Row, gélose N. N. N. Les Trypanosomides trouvent, dans le sang total peu dilué, tous les matériaux qui leur permettent l'édification de leur propre substance.

Pour étudier la nature des substances utilisables comme sources azotées, il fallait donc d'abord éliminer la cause d'erreur que crée la présence d'une trop forte quantité de sang, et pour cela rechercher en premier lieu la plus petite quantité de sang capable de permettre la culture indéfinie des organismes étudiés. La quantité minima indispensable de sang a donc été tout d'abord établie dans un milieu peptoné favorable (eau peptonée, peptone Chapoteaut, v. p. 65). On reviendra longuement dans les pages qui suivent sur l'importance et la signification de la nécessité du sang. Mais il faut dire déjà ici, pour rendre plus compréhensible cet exposé, que la quantité minima indispensable de sang est pour *Leptomonas ctenocephali* de 1/500, pour *Strigomonas fasciculata* de 1/20.000. Quant à *Leptomonas oncopelti*, il est capable d'effectuer sa multiplication en l'absence totale de sang.

Un autre point important devait alors être élucidé : comment se comportent les *Leptomonas* quand cette quantité de sang, suffisante, mais indispensable, leur est fournie, non plus dans un milieu nutritif (solution de peptone), mais dans un liquide non nutritif (eau physiologique, liquide de Ringer)? Autrement dit, la culture des *Leptomonas* est-elle possible en milieu non

nutritif additionné de la quantité minima de sang indispensable ?

Les résultats des expériences ont été les mêmes pour *Leptomonas ctenocephali* et *Strigomonas fasciculata*, quel que soit le liquide physiologique utilisé (liquide de Locke, liquide de Ringer, eau physiologique). Je donnerai ici seulement les détails des expériences faites avec l'eau physiologique.

Dans 8 à 10 cent. cubes d'eau physiologique à 6 p. 1.000, à  $pH = 7,00 - 7,2$ , on introduit la quantité de sang nécessaire pour obtenir des dilutions de 1/100 à 1/1.000 pour *L. ctenocephali*, de 1/2.000 à 1/20.000 pour *Str. fasciculata*. Onensemence à partir d'une culture en peptone + sang à 1/200 pour *L. ctenocephali*, en peptone + sang à 1/5.000 pour *Str. fasciculata*.

TABLEAU I. — Comparaison entre la culture de *Leptomonas ctenocephali* et *Strigomonas fasciculata* en eau physiologique et en eau peptonée.

MILIEU	QUANTITÉ DE SANG								
	1/50	1/100	1/500	1/1 000	1/2.000	1/5.000	1/10 000	1/20 000	0
<i>Leptomonas ctenocephali.</i>									
Eau physiologique 6 p. 1.000 (ou Ringer, ou Locke). .	+	$\overline{+}$	0	0	0	0	0	0	0
Eau peptonée. . . . .	++	++	++	$\pm$	0	0	0	0	0
<i>Strigomonas fasciculata.</i>									
Eau physiologique 6 p. 1.000 (ou Ringer, ou Locke). .	+	+	$\overline{+}$	0	0	0	0	0	0
Eau peptonée. . . . .	++++	++++	++++	++++	++++	++	++	+	$\overline{+}$
+, bonne culture; $\pm$ , mauvaise culture; $\overline{+}$ , culture non repiquable; +++++, culture en voile; ++, culture en anneau.									

*Leptomonas ctenocephali.* — Trois essais effectués : résultats toujours entièrement négatifs, soit en eau physiologique seule, soit en eau physiologique + 1/100, 1/200, 1/500, 1/1.000 de sang défibriné de lapin.

*Strigomonas fasciculata*. — Quatre essais : Résultats entièrement négatifs avec eau physiologique + 1/5.000, 1/10.000, 1/20.000 de sang. En eau physiologique + 1/2.000 de sang : deux passages possibles, mais des cultures pauvres. Troisième repiquage impossible.

Pour les deux espèces :

Témoins en eau physiologique = 0.

Témoins en peptone + sang = voiles.

On sait, par conséquent :

1° Que les Trypanosomides sont capables d'effectuer la synthèse de leurs constituants à partir des éléments du sang, comme le montre la possibilité de culture en milieu de Row en milieu de Ponselle pour *Trypanosoma inopinatum*, en gélose N. N. N ;

2° Le sang, présent à faibles doses dans des milieux non nutritifs, ne peut suffire à assurer la nutrition des Trypanosomides.

Ceci établi, il devenait possible de rechercher systématiquement les substances à partir desquelles les *Leptomonas* se montreraient capables d'effectuer la synthèse de leurs constituants. Pour cela, j'ai expérimenté avec des milieux constitués par des solutions de peptones diverses, ainsi qu'un autolysat de levure de boulangerie à divers degrés d'hydrolyse.

Je ne crois pas utile de donner ici des généralités sur les peptones. On peut se rapporter pour cette question au livre d'Effront : « Les catalyseurs biochimiques » et à la monographie de A. Lwoff : « Recherches biochimiques sur la nutrition des Protozoaires ». Il faut préciser cependant que, lorsqu'il est parlé dans un travail de peptones, c'est toujours de peptones commerciales qu'il s'agit, c'est-à-dire de substances renfermant, en dehors des « peptones vraies » (qui répondent celles-ci à une définition chimique précise), d'autres produits de l'hydrolyse des protides.

Quant à l'autolysat de levure, il résulterait du travail de plusieurs diastases et serait d'une composition analogue à celle des peptones provenant de digestions pepsique ou trypsique du muscle.

Comme stades divers de la digestion du muscle, quatre peptones ont été étudiées, l'une résultant d'une digestion pepsique



ménagée du muscle, deux autres, de digestion pancréatique, l'une de début, l'autre plus poussée; enfin, la quatrième, résultant de la digestion très poussée, pepsique, trypsique, puis éreptique du muscle (éreptone). Ont été étudiées aussi la peptone de caséine et la peptone de soie, celle-ci résultant de l'hydrolyse de la séricine de la soie par la chaux.

Les tubes renferment de 8 à 10 cent. cubes d'eau peptonée (formule v. p. 65). On ajoute, dans les tubes destinés à *Leptomonas ctenocephali*, 1/100 à 1/250 de sang défibriné, et dans ceux destinés à *Strigomonas fasciculata*, 1/1.000 à 1/5.000.

Les expériences sur *Strigomonas oncopelti* sont faites en eau peptonée seule, totalement privée de sang.

L'ensemencement est fait avec 11 gouttes de culture riche en eau peptonée + sang (*L. ctenocephali*, *Str. fasciculata*), en eau peptonée (*Str. oncopelti*).

Voici les résultats détaillés pour *Leptomonas ctenocephali*. On verra qu'ils sont applicables, à peu de chose près, aux autres espèces.

1° *Peptone pepsique de muscle*. — Culture positive riche le cinquième jour; voile le treizième jour; anneau encore très riche le quarante et unième jour.

2° *Peptone pancréatique de muscle* (début de digestion). — Culture positive le huitième jour; anneau le dixième; voile le treizième; subsiste encore le trente-cinquième jour.

3° *Peptone très amincée* (digestion pancréatique prolongée). — Culture positive le dix-septième jour; anneau le trente-troisième; voiles très rares et très fugaces.

4° *Ereptone* (digestion pepsique, trypsique et éreptique). — Milieu abiurétique. Première culture très faible au bout de vingt-cinq jours. Pas de repiquage possible.

5° *Peptone de caséine et peptone de soie*. — Jamais de culture, même au premier repiquage.

Les chiffres représentent une moyenne faite entre trois passages.

*Strigomonas fasciculata* et *Str. oncopelti* ont un comportement analogue à celui de *Leptomonas ctenocephali*, à la différence près des besoins en sang. Le tableau n° 1 exprime clairement ces résultats.

Toutes les peptones dont il a été question jusqu'ici étaient

des peptones animales (digestion du muscle); deux peptones végétales (arachide), l'une pepsique, l'autre pancréatique, se sont montrées parfaitement utilisables aussi par les *Leptomonas*.

En dehors des peptones, j'ai étudié aussi un autolysat de levure préparé au laboratoire. Voici comment on le prépare : on émulsionne 250 grammes de levure de boulangerie dans 300 cent. cubes d'eau distillée. On porte à l'étuve à 50-55° (ne pas dépasser 55°). Au bout de quarante-huit heures, on a une hydrolyse suffisante. On amène alors l'émulsion à 1 litre en ajoutant de l'eau distillée. On y verse un blanc d'œuf, on porte à l'autoclave vingt minutes à 120°; on passe sur un linge, on filtre sur papier. On ajoute au liquide recueilli quatre fois son volume d'eau distillée (dans laquelle on a introduit les sels nécessaires au milieu). Répartir en tubes stérilisés. On peut faire des prélèvements à divers moments pour avoir des degrés successifs d'hydrolyse.

Dans l'autolysat de quarante-huit heures, les trois *Leptomonas* donnent des cultures extrêmement riches. La quantité de sang à ajouter pour *Lept. ctenocephali* et *Str. fasciculata* est la même que dans les milieux peptonés.

Les Trypanosomides étudiés ici effectuent donc le mieux leur nutrition dans les milieux renfermant des substances protidiques peu dégradées : peptones pepsique ou pancréatique de muscle ou d'arachide, ou autolysat de levure peu autolysée. Ils ne sont pas capables d'effectuer la synthèse de leurs constituants à partir des mélanges d'acides aminés (éreptone). Leur développement s'effectue le mieux aux dépens des protéoses et des polypeptides.

Au point de vue de la nutrition azotée, ils se comportent donc exactement comme *Glaucoma piriformis* (Cilié). Celui-ci, ainsi que A. Lwoff (1923, 1932) l'a montré, a besoin pour effectuer sa synthèse azotée de polypeptides ; solution de peptones résultant de l'hydrolyse pepsique ou pancréatique ménagée du muscle, ou autolysat de levure.

Si l'on compare ce tableau récapitulatif des besoins azotés de *Glaucoma piriformis* à ceux des *Leptomonas*, on voit que ceux-ci se superposent exactement à ceux-là. Je n'ai pas essayé de remplacer l'éreptone par des mélanges d'acides aminés ou des

acides aminés isolés, ou des sels d'ammonium. Les insuccès totaux et plusieurs fois répétés avec l'éreptone et la soie hydrolysée m'ont paru suffisants pour montrer que les *Leptomonas* ne peuvent effectuer leurs synthèses azotées qu'à partir des polypeptides. Si l'on veut les faire entrer dans une catégorie physiologique définie, c'est dans le groupe des « métatrophes ». Les métatrophes sont en effet des « organismes incapables d'effectuer la synthèse de tous leurs acides aminés à partir de  $\text{NH}_3$ . Une source azotée organique complexe leur est nécessaire ». (A. Lwoff, p. 111).

*Glaucoma piriformis* (nutrition azotée).

Nitrates. . . . .	0
Sels d'ammonium . . . . .	0
Acides aminés isolés . . . . .	0
Mélange d'acides aminés . . . . .	0
Soie hydrolysée . . . . .	0
Ereptone . . . . .	0
Peptone de muscle très hydrolysée . . . . .	+
Peptone pancréatique de muscle (début de digestion) . . . . .	++
Peptone pepsique de muscle. . . . .	++
Peptone pepsique d'arachide. . . . .	++

(D'après A. Lwoff, 1932).

Ces résultats sont en accord avec ceux de Salle et Schmidt (1928) qui ont étudié le métabolisme de *Leishmania tropica*. Leurs expériences ont montré que les *Leishmania* utilisent les protéines totales, ou les premiers produits de la dégradation des protéines. Salle et Schmidt ont montré l'utilisation des protéines, d'une part, par l'augmentation de la quantité d'ammoniaque dans les milieux après un certain temps de culture, d'autre part, par l'augmentation des produits d'hydrolyse des protéines.

*Leishmania tropica*, en outre, liquéfie la gélatine, tout comme *Glaucoma piriformis*, *Leptomonas ctenocephali*, *Strigomonas fasciculata*.

\* \* \*

Cependant, dans des publications récentes, Cleveland et Collier (1930), d'une part, H. Galliard (1934), d'autre part, ont annoncé qu'ils pouvaient obtenir la culture de divers Trypanosomides dans des milieux constitués simplement par une

solution de glucose. Cleveland et Collier ont expérimenté avec la majorité des souches de Noguchi et Tilden (1926) et Galliard avec *Herpetomonas culicidarum*.

TABLEAU II. — Comparaison entre la nutrition azotée des Trypanosomides et celle d'un Cilié libre *Glaucoma piriiformis*.

			PEPTONE PEPSIQUE de muscle	PEPTONE PANCRÉATIQUE muscle 1	PEPTONE PANCRÉATIQUE muscle 2	MEPTONE (muscle)	PEPTONE PEPSIQUE arachide	AUTOLYSAT de levure	SOIE HYDROLYSÉE
Trypanosomides Flagellés parasites)	Ayant besoin de sang.	<i>Leptomonas clenocephali.</i>	+	+	+	0	+	+	0
		<i>Strigomonas fasciculata.</i>	+	+	+	0	+	+	0
	N'ayant pas besoin de sang.	<i>Strigomonas oncopelti.</i>	+	+	+	0	+	+	0
Cilié libre.		<i>Glaucoma piriiformis.</i>	+	+	+	0	+	+	0

Ces résultats peuvent paraître tout d'abord surprenants. Les milieux décrits sont, en effet, totalement dépourvus d'azote, même sous forme de composés minéraux. Comment, dans ces conditions, les *Leptomonas* peuvent-ils effectuer leurs synthèses azotées? Ni Cleveland et Collier, ni Galliard n'ont posé cette question.

Deux hypothèses, cependant, peuvent être envisagées pour expliquer ces résultats. Celle, d'abord, de l'assimilation directe, par les *Leptomonas*, de l'azote atmosphérique. On ne connaît jusqu'ici que certaines bactéries qui soient capables d'assimiler l'azote atmosphérique, bactéries fixatrices d'azote. Mais, parmi les Protistes eucaryotes, on n'en a encore aucun exemple. On a cru pouvoir accorder à des Algues unicellulaires la faculté de fixer l'azote de l'air, mais on a reconnu, dans tous les cas, qu'on avait expérimenté avec des cultures impures et que le travail d'assimilation de l'azote atmosphérique était dû



à des bactéries. Les *Leptomonas* seraient donc les seuls Protozoaires qui soient doués du pouvoir de fixer l'azote atmosphérique.

La deuxième hypothèse est la suivante : les *Leptomonas*, capables de se multiplier dans ces milieux sans azote, seraient parasites ou plutôt vivraient en symbiose avec une bactérie. C'est cette bactérie qui serait capable de fixer l'azote et d'élaborer des composés nitrés assimilables par les *Leptomonas*. Elles joueraient, en quelque sorte, un rôle analogue à celui des bactéries fixatrices d'azote des nodosités des Légumineuses, qui préparent le travail de synthèse azotée de la plante. Une telle symbiose est encore inconnue chez les Trypanosomides. On voit les conditions que cette hypothèse exige réunies : 1° qu'il y ait symbiose avec une bactérie ; 2° que cette bactérie soit fixatrice d'azote ; 3° que les composés qu'elle élabore soient utilisables par les *Leptomonas*.

Les résultats de Cleveland et Collier et ceux de Galliard peuvent s'expliquer autrement si ces chercheurs n'ont pas effectué de passages en série. On peut observer souvent des cultures positives au deuxième et même troisième passage dans des milieux défavorables. L'ensemencement large apporte un peu de substance nutritive grâce à laquelle les flagellés sont capables de vivre et de se multiplier.

Pour ma part, je n'ai jamais réussi à cultiver *Strigomonas oncopelti* dans des solutions de glucides, que les milieux soient stérilisés ou filtrés, qu'ils soient acides ou neutres. Le premier repiquage même, qui, dans maintes circonstances, est rendu positif par l'apport des substances nécessaires en quantité suffisante, a toujours été négatif, bien qu'il ait été largement effectué (X gouttes d'une culture en voile).

#### IV. — Étude du rôle du sang.

Les produits de l'hydrolyse ménagée des protides sont donc les éléments nécessaires et suffisants pour assurer la nutrition azotée des Trypanosomides. Les trois *Leptomonas* que j'ai étudiés ont exactement les mêmes besoins azotés. Ils peuvent tous utiliser certaines pep'ones (pepsique de muscle, pancréa-

tique de muscle, pepsique et pancréatique d'arachide) et l'autolysat de levure, mais non les peptones résultant de la digestion prolongée des protides, ni l'éreptone (mélange d'acides aminés), la caséine dégraissée, la soie hydrolysée.

Ces solutions de peptone renferment-elles tous les éléments indispensables à la culture des Trypanosomides? Comme je l'ai déjà dit, il est unanimement reconnu que le sang — ou un de ses constituants — est indispensable à la culture des Trypanosomides. Mais, ici, quelques remarques sont indispensables.

On croyait jusqu'ici connaître un Trypanosomide faisant exception à la règle quasi-générale de la nécessité du sang : *Strigomonas fasciculata*. La plupart des chercheurs qui ont eu des cultures de ce *Leptomonas* (Novy-Mc Neal-Torrey, Fraenkel, Mesnil, Nöller...) ont remarqué la grande facilité avec laquelle il se multiplie sur gélose ordinaire et en bouillon ordinaire et ont entretenu les souches dans ces milieux. *Strigomonas fasciculata* se montrait donc capable de se multiplier dans des milieux qui conviennent aux bactéries libres et, fait nouveau dans l'histoire des Trypanosomides, il semblait pouvoir se passer de sang. Cependant, la possibilité pour *Strigomonas fasciculata* de se multiplier en bouillon ordinaire et sur gélose ordinaire démontre-t-elle que ce flagellé n'a pas besoin de sang ou de l'un des constituants du sang? Ce qui forme la base du bouillon nutritif (ou de la gélose nutritive) est, comme chacun sait, une macération (vingt-quatre heures) de viande de bœuf. La macération contient, selon toute évidence, une notable quantité d'hématine. Cette hématine a une double origine : 1° hématine du sang ; 2° hématine du muscle. D'après Keilin (1927), « l'hémoglobine musculaire a les mêmes propriétés et la même structure que l'hémoglobine du sang » (p. 26). Que l'hématine ainsi présente dans la macération soit ensuite chauffée, stérilisée, nous savons que cela n'a pas d'importance puisque le sang chauffé conserve son pouvoir actif (v. p. 69). Enfin, il existe dans le muscle en dehors de l'hémoglobine, chez les Vertébrés, du cytochrome. Il n'est donc pas possible de tirer — du fait que *Strigomonas fasciculata* se multiplie en bouillon ordinaire et sur gélose ordinaire — la conclusion qu'il n'a pas besoin de « sang ».

Le flagellé peut-il se multiplier dans une solution de peptone? Je n'ai jamais pu obtenir de culture indéfinie de *Strigomonas fasciculata* en solution peptonée seule, quelle que soit la peptone utilisée, animale ou végétale, pepsique ou pancréatique. Il n'est pas impossible d'obtenir, dans ces solutions peptonées, un, deux ou même trois passages. Mais il est bien rare, suivant la quantité de flagellés ensemencés, qu'on puisse dépasser le deuxième (parfois le premier), en tout cas *tout à fait exceptionnellement* le troisième. La culture indéfinie est impossible.

Donc *Strigomonas fasciculata* paraît se contenter de la minime quantité de « sang » présente dans le bouillon nutritif ordinaire, mais ne peut se multiplier dans les solutions peptonées. L'élément, présent dans celui-là et absent dans celles-ci, est, selon toute évidence, un élément du sang.

L'intérêt que présente l'étude de *Strigomonas fasciculata* se trouve donc transformé : il n'est pas, comme on le croyait, un Trypanosomide qui peut se passer totalement de sang ; c'est un Trypanosomide qui a besoin de sang, mais seulement d'une très petite quantité de sang.

Il existe bien cependant un Trypanosomide qui peut se multiplier en l'absence de sang ou d'un de ses constituants : *Strigomonas oncopelti*. La culture indéfinie de *Str. oncopelti* est possible dans les solutions peptonées où ne se produit jamais la culture de *Strigomonas fasciculata*. On peut cultiver indéfiniment *Strigomonas oncopelti* dans des milieux à base de peptones pepsiques animales ou végétales ou pancréatiques animales ou végétales. On peut affirmer que ces peptones ne renferment pas de sang ou l'un de ses composants : par suite des digestions pepsique et trypsique, les composés hématiniques (ou le cytochrome) sont certainement détruits. En tout cas, les solutions de peptone ne donnent pas la réaction des peroxydases (benzidine, eau oxygénée). On verra par la suite l'intérêt de cette remarque. J'entretiens *Strigomonas oncopelti* en solution peptonée totalement privée de sang depuis le mois de mars 1930. Il ne s'est jamais produit le moindre changement dans la marche des cultures (voir page 67). Donc *Strigomonas oncopelti* est actuellement le seul Trypanosomide qui soit reconnu capable de se multiplier dans des milieux dépour-

vus de sang (1). Comme, par ailleurs, il ne peut se développer dans des solutions de peptones incomplètes auxquelles manquent des acides aminés (comme la soie hydrolysée) et à plus forte raison dans l'éreptone (mélange d'acides aminés), il est donc d'un type tout à fait comparable à *Glaucoma piriformis* (Cilié). On y reviendra plus loin.

En résumé : à *Strigomonas fasciculata* il faut fournir une très petite quantité de sang (celle qui est présente dans le bouillon nutritif peut être suffisante), mais le sang est indispensable.

Quant à *Strigomonas oncopelti*, il se multiplie dans des milieux totalement privés de sang où *Str. fasciculata* est incapable de se multiplier.

#### QUANTITÉ MINIMA INDISPENSABLE DE SANG.

Il est donc impossible d'entretenir *Leptomonas ctenocephali* et *Strigomonas fasciculata* en milieu peptoné dépourvu de sang.

Comment agit le sang, c'est ce qu'il faut maintenant étudier, et d'abord il faut déterminer, pour chaque espèce, quelle est la quantité minima de sang qui est capable d'assurer sa culture indéfinie. Les résultats principaux ont été publiés dans ces notes préliminaires (1928, 1930), mais je vais les rappeler ici.

Disons d'abord que divers essais ont été faits avec des peptones différentes, mais qu'en définitive toutes celles qui ont été utilisées ont donné des résultats analogues. Bien que les premières expériences aient été faites en peptone Chapoteaut, puis en peptone pepsique de muscle (Vaillant), puis en peptone pepsique d'arachide (Vaillant), la quantité de sang minima indispensable s'est toujours montrée la même pour une espèce

(1) THOMSON (1930) a obtenu la culture de *Herpetomonas culicidarum* sur gélose et en bouillon ordinaires : *H. culicidarum* se comporte donc, d'après ce que l'on en sait jusqu'ici, comme *Strigomonas fasciculata*. Peut-être *H. culicidarum* devra-t-il rentrer dans le type physiologique métatrophe (*Glaucoma piriformis*, *Strigomonas oncopelti*) quand sa nutrition aura été précisée. Ajoutons que Nöller a émis l'opinion que *Str. fasciculata* Novy, Mac Neal et Torrey, et *H. culicidarum* Noguchi et Tilden ne constituent qu'une seule et même espèce ; cette opinion, qui est *a priori* aussi la mienne, sera entièrement valable quand l'identité des besoins nutritifs des deux espèces aura été démontrée.



donnée. Les résultats dont on trouvera ici le détail ont été obtenus avec la peptone pepsique d'arachide.

Rappelons pour mémoire la préparation du milieu :

Peptone . . . . .	20
NaCl . . . . .	6
Eau redistillée . . . . .	1.000
Ajuster à pH . . . . .	7,00-7,2

Précipiter les phosphates par chauffage à 120° pendant vingt minutes. Filtrer. Répartir dans les tubes des quantités connues à la pipette graduée : 8, 10, 12 cent. cubes suivant la dilution de sang qu'on désire obtenir. Stériliser à 115° pendant vingt minutes.

On a toute latitude pour faire les dilutions de sang de la manière qui semble le plus pratique. On se sert de pipettes graduées stérilisées.

Je fais généralement des dilutions à 1/10, 1/100, 1/200, 1/500, 1/1.000, 1/2.000, 1/5.000, 1/10.000, etc., mais on peut faire, si c'est nécessaire, des dilutions intermédiaires.

Le sang est prélevé comme toujours par ponction aseptique du cœur du lapin et défibriné.

Chaque expérience comporte au moins six tubes pour chaque dilution et chaque organisme étudié.

Je donne d'abord, avec le plus de détails possible, les résultats des cinq premiers passages comparativement avec les deux *Leptomonas*. On aura donc ainsi toujours en regard les différences qui séparent ces deux espèces.

Pour chacune des espèces, le premier passage comportait :

6 tubes contenant du sang dilué à . . . . .	1/50
6 tubes contenant du sang dilué à . . . . .	1/100
6 tubes contenant du sang dilué à . . . . .	1/200
6 tubes contenant du sang dilué à . . . . .	1/500
6 tubes contenant du sang dilué à . . . . .	1/1.000
6 tubes contenant du sang dilué à . . . . .	1/2.000
6 tubes contenant du sang dilué à . . . . .	1/5.000
6 tubes contenant du sang dilué à . . . . .	1/10.000
6 tubes contenant du sang dilué à . . . . .	1/20.000
6 tubes contenant du sang dilué à . . . . .	1/50.000
Six tubes témoins ne contenant que de l'eau peptonée.	

Le premier ensemencement a été fait : pour *Leptomonas ctenocephali* à partir d'un voile jeune en bouillon-sang prélevé avec ménagement afin d'entraîner le moins de sang possible ; pour *Strigomonas fasciculata*, à partir d'une culture en bouillon ordinaire.

Les résultats du premier passage ont été comparativement :

	1/50	1/100	1/200	1/500	1/1.000	1/2.000	1/5.000	1/10.000	1/20.000	1/50.000	0
<i>L. ctenocephali</i> .	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	0	0	0
<i>Str. fasciculata</i> .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	±

+++ , culture en voile ; ++ , culture en anneau ; + , culture riche ; ± , culture pauvre.

Au deuxième passage, les dilutions utilisées pour *Leptomonas ctenocephali* furent arrêtées à 1/20.000 ; pour *Strigomonas fasciculata*, pas de changement. L'ensemencement est fait, pour chaque espèce, à partir de la culture produite dans les tubes renfermant la plus grande dilution, c'est-à-dire, pour *L. ctenocephali*, le 1/10.000 (v. plus haut), pour *Str. fasciculata* 1/50.000, la culture témoin étant trop pauvre.

Le deuxième passage a donné respectivement :

	1/50	1/100	1/200	1/500	1/1.000	1/2.000	1/5.000	1/10.000	1/20.000	1/50.000	0
<i>L. ctenocephali</i> .	+++	+++	++	+	+	0	0	0	0	(1)	0
<i>Str. fasciculata</i> .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	±	0

L'ensemencement pour le troisième passage, et pour les suivants, a eu lieu suivant toujours le même principe, à partir du tube renfermant une culture, dans la plus forte dilution. En l'espèce, ici, pour *Leptomonas ctenocephali* : 1/1.000, pour *Str. fasciculata* : 1/20.000. Toujours des tubes témoins, totalement privés de sang. On a obtenu :

#### Troisième passage.

	1/50	1/100	1/200	1/500	1/1.000	1/2.000	1/5.000	1/10.000	1/20.000	1/50.000	0
<i>L. ctenocephali</i> .	+++	+++	++	+	±	0					0
<i>Str. fasciculata</i> .	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	0	0

## Quatrième passage.

	1/50	1/100	1/200	1/500	1/1.000	1/2.000	1/5.000	1/10.000	1/20.000	1/50.000	0
<i>L. ctenocephali</i>	+++	+++	++	+	0						0
<i>Str. fasciculata</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	0	0

## Cinquième passage.

	1/50	1/100	1/200	1/500	1/1.000	1/2.000	1/5.000	1/10.000	1/20.000	1/50.000	0
<i>L. ctenocephali</i>	+++	+++	++	+	0						0
<i>Str. fasciculata</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++ } + ou ++	++ } + ou ++			0

A partir du cinquième passage, les résultats se sont stabilisés, et, aux passages suivants, sixième, septième, huitième, se sont montrés les mêmes.

Le tableau III résume l'expérience avec *Leptomonas ctenocephali*. Il montre clairement que la dose minima de sang indispensable à l'entretien de ce flagellé en eau peptonée est 1/500.

La dose minima de sang indispensable à l'entretien de *Strigomonas fasciculata* en eau peptonée est donc de 1/20.000, comme cela ressort du tableau n° IV (1).

Si maintenant on veut comparer les résultats obtenus avec tous les Trypanosomides étudiés de ce point de vue (il y en a 4), on voit qu'on obtient une échelle croissante ou décroissante de dilutions, suivant qu'on adopte un ordre ou bien l'autre.

(1) Ces chiffres sont valables dans les conditions où j'ai expérimenté, c'est-à-dire à 20° environ, les tubesensemencés avec une infime quantité de flagellés, la concentration initiale ne dépassant pas 5 individus par mm<sup>3</sup>. Au cours d'expériences quantitatives plus précises, j'ai pu constater que l'action du sang (sang hémolysé) était encore manifeste pour *Strigomonas fasciculata* à une concentration de 1/500.000, mais ceci à 23° (température optima), la concentration initiale en flagellés étant 2 à 300 individus par mm<sup>3</sup>. Dans ces conditions, on peut entretenir la culture dans de l'eau peptonée contenant 1/200.000 de sang; les cultures obtenues renfermant au point maximum du développement 15 à 20.000 flagellés par mm<sup>3</sup>.

TABLEAU III. — Quantité minima de sang indispensable  
à la culture de *Leptomonas ctenocephali*.

PASSAGES N°	QUANTITÉ DE SANG										
	1/50	1/100	1/200	1/500	1/1.000	1/2.000	1/5.000	1/10.000	1/20.000	1/50.000	0
1	++++	++++	++++	++++	++	+	+	++	0	0	0
2	++++	++++	++++	++	+	++	++	0	0	0	0
3	++++	++++	++++	++	±	0	0	0	0	0	0
4	++++	++++	++	+	++	0	0	0	0	0	0
5	++++	++++	++	+	0	0					0
6	++++	++++	++	+	0	0					0
7	++++	++++	++	+	0	0					0
8	++++	++++	++	+	0						0

++++, culture en voile; ++, culture en anneau; +, bonne culture; ±, culture pauvre; ++, culture non repiquable.

TABLEAU IV. — Quantité minima de sang indispensable  
à la culture de *Strigomonas fasciculata*.

PASSAGES N°	QUANTITÉ DE SANG										
	1/50	1/100	1/200	1/500	1/1.000	1/2.000	1/5.000	1/10.000	1/20.000	1/50.000	0
1	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++	+	±
2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	++	±
3	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	+	0	0
4	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	+	0	0
5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	+	0	0
6	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	+	0	0
7	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	+	0	0
8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	+	0	0



C'est ce que montre le tableau suivant :

<i>Strigomonas oncopelti</i> . . . . .	0
<i>Strigomonas fasciculata</i> . . . . .	1/20.000
<i>Leptomonas pyrrhocoris</i> (Zotta) . . . . .	1/5.000
<i>Leptomonas ctenocephali</i> . . . . .	1/500

Il existe donc, pour chacun des *Trypanosomides*, une quantité de sang minima indispensable à leur entretien en milieu peptoné. Un seul fait jusqu'ici exception à la règle et peut se multiplier à partir des seuls protéides: *Strigomonas oncopelti*.

TABLEAU V. — Tableau comparatif des quantités minima de sang indispensables à divers trypanosomides : *L. pyrrhocoris* (Zotta, 1923), *Str. oncopelti*, *Str. fasciculata*, *L. ctenocephali* (M. Lwoff).

FLAGELLÉS	QUANTITÉ DE SANG									
	1/50	1/100	1/200	1/500	1/1.000	1/2.000	1/5.000	1/10.000	1/20.000	1/50.000
<i>Strigomonas oncopelti</i> . . . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Strigomonas fasciculata</i> . . . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
<i>Leptomonas pyrrhocoris</i> . . . . .	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
<i>Leptomonas ctenocephali</i> . . . . .	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0

Nota : Dans ce tableau, les croix n'indiquent pas la densité relative de la culture, mais seulement sa réalité.

Dans le paragraphe consacré à l'étude de la nutrition azotée (voir page 72), on a vu que la culture des *Leptomonas* n'est pas possible dans un milieu constitué par un liquide physiologique (liquides de Locke, de Ringer, eau physiologique), additionné de la quantité minima de sang qu'il faut ajouter aux milieux peptonés. En l'absence de peptone, le sang peut fournir tous les éléments nécessaires à la nutrition des flagellés mais à condition qu'il soit présent à de hautes concentrations.

## L'ÉLÉMENT ACTIF DU SANG : L'HÉMATINE.

Une fois établi le rôle du sang dans les milieux peptonés, il était intéressant de rechercher quel pouvait être l'élément actif qu'il renferme.

Il faut tout d'abord éliminer les constituants du sang qui ne sont pas capables de provoquer la culture des *Leptomonas* en eau peptonée. Dans cette catégorie, entre le sérum. Je n'ai jamais pu obtenir de culture de *Leptomonas ctenocephali* en présence de sérum : sérum coagulé, sérum pur, sérum dilué à diverses concentrations dans l'eau physiologique ou l'eau peptonée, sérum inactivé. Le plus souvent, le premier passage même est négatif. Quant à *Strigomonas fasciculata*, il peut être cultivé en eau peptonée + sérum, par exemple, pendant 1, 2, 3, parfois 4 passages. Les résultats sont très irréguliers. Mais la culture indéfinie est impossible. Les quelques résultats qu'on obtient sont dus à la présence de traces d'hémoglobine restées dans le sérum. Il est difficile d'obtenir du sérum parfaitement exempt de toute trace d'hémoglobine. Comme on sait que 1/20.000 de sang défibriné suffit à assurer l'entretien de *Strigomonas fasciculata*, il est facile de concevoir qu'il peut rester, dans le sérum, la très faible quantité d'hémoglobine indispensable.

J'ai parlé d'« hémoglobine indispensable », anticipant ici sur ce qui va suivre ; on va voir bientôt que c'est bien l'hémoglobine en effet qui renferme l'élément actif du sang.

Je ne connais guère que deux travaux qui traitent de la recherche de l'élément indispensable du sang chez les Trypanosomides.

Drbohlav (1925) essaie, mais en vain, de substituer à l'hémoglobine du sang, l'hémoglobine cristallisée, pour cultiver *Leptomonas ctenocephali*.

Salle et Schmidt (1928), ayant pour dessein d'étudier le métabolisme des *Leishmania in vitro*, cherchent à établir un milieu commode pour des dosages chimiques. Ils remplacent le sang par de l'hémoglobine qu'ils préparent eux-mêmes par lyse des hématies après de nombreux lavages dans des solutions salines. Il faut dire que la solution d'hémoglobine qu'ils obtiennent ne

diffère pas beaucoup de celle utilisée par Row pour son milieu liquide. Salle et Schmidt obtiennent des cultures de *Leishmanies* et examinent le rôle possible de l'hémoglobine ; ils en supposent trois :

1° Elle fournirait aux organismes un composé complexe, nécessaire à la constitution du protoplasme ; cette hypothèse est éliminée en raison des échecs survenus dans les tentatives de substitution à l'hémoglobine de la chlorophylle ou de composés pyrroliques.

2° L'hémoglobine servirait de transporteur d'oxygène.

3° L'hémoglobine représenterait un facteur accessoire de croissance. C'est à cette dernière hypothèse que se sont ralliés les auteurs.

Mais c'est surtout d'un chapitre important de la physiologie bactérienne que l'on se devait de rapprocher les constatations et les résultats des expériences faites sur les *Trypanosomides*. Les exigences trophiques des Bactéries dites « hémophiles » sont en effet très semblables à celles des *Trypanosomides*. L'étude de la nutrition comparée de ces deux groupes de Protistes trouve sa place à la fin de ce travail, mais il faut brièvement rappeler ici quelques faits principaux.

Les milieux utilisables pour les bactéries hémophiles, dont le type est le bacille de Pfeiffer, comprennent deux parties bien distinctes : l'une que l'on peut appeler nutritive proprement dite (gélose bactériologique ordinaire, bouillon ordinaire), l'autre, formée d'éléments dont le rôle n'est pas complètement bien connu. Ces éléments indispensables, désignés le plus souvent comme « favorisants » ou « activants », sont en général de deux sortes : l'un, dénommé le facteur « V » (Thjötta et Avery), se rapproche par ses propriétés de certaines vitamines ; il existe dans les extraits de végétaux crus (pomme de terre, banane, etc...) ; il est assez thermolabile : son action est détruite par chauffage prolongé à 120° ; il est soluble dans l'eau et passe à travers les filtres. Certaines variétés de bacilles de Pfeiffer peuvent se multiplier à partir de ce seul facteur « V » ajouté au milieu de base.

L'autre facteur, désigné sous le nom de « facteur X » par Thjötta et Avery, est thermostable, agit à de très grandes dilutions, existe dans le sang total, les globules rouges laqués,

l'hémoglobine cristallisée, l'hématine, l'hémine, mais non dans l'hématoporphyrine, dépourvue de fer et qui ne donne pas la réaction des peroxydases. Il est absent du sérum et de la globine des hématies. Il suffit à l'entretien de certaines souches de bacilles hémophiles. Mais le plus souvent la présence simultanée des facteurs « X » et « V » est indispensable.

Il est facile de voir que le facteur « X » indispensable aux bactéries hémophiles a de nombreux caractères communs avec le facteur indéterminé du sang indispensable aux Trypanosomides. Et c'est pourquoi il convenait de rechercher si l'hématine, fraction colorée de l'hémoglobine, se montrerait capable de déterminer la culture des *Leptomonas*. Ce sont ces essais que je vais exposer maintenant.

L'hématine que j'ai utilisée est l'hématine de Merck préparée suivant la méthode de Nencki.

Les expériences ont été faites en prenant comme milieu de base l'eau peptonée préparée avec une peptone pepsique végétale (peptone pepsique d'arachide : voir formule du milieu et technique de préparation, page 65). L'hématine n'étant pas soluble dans l'eau, on fait la solution mère d'hématine (qui sera diluée ensuite dans l'eau peptonée) dans une solution de carbonate neutre de soude de 0,1 à 0,5 p. 100 par exemple. Le taux même de la solution d'hématine est naturellement variable et varie suivant les dilutions que l'on veut définitivement obtenir en eau peptonée. Une solution d'hématine à 0,025 p. 100, par exemple, est pratique. On opère ensuite de façon à avoir, en eau peptonée, l'échelle de dilution voulue. Dans mes expériences, j'ai fait des dilutions allant de 1/1.000 à 1/640 000. Tenant compte et des résultats que j'avais obtenus avec le sang et de la proportion d'hématine contenue dans le sang, je n'ai pas cru utile de faire des dilutions moins fortes que 1/1.000. Quant à la plus grande dilution, elle a été naturellement déterminée par l'expérimentation.

Il faut faire ici une importante remarque. L'hématine est soluble uniquement en milieu alcalin. Si on introduit une solution d'hématine dans un milieu neutre ou très légèrement alcalin ( $pH = 7,2 - 7,4$ ), une partie de l'hématine dissoute précipite et le taux de dilution s'en trouve faussé. Toutes les expériences décrites ont été faites à  $pH$  variant de 7,2 à 7,6



(dans un milieu plus alcalin, *Strigomonas fasciculata* se multiplie moins facilement, et *Leptomonas ctenocephali* très mal ou pas du tout). Dans ces conditions, une partie de l'hématine ayant précipité, les taux de dilution que je donne n'ont pas de valeur quantitative absolue. Les résultats n'en sont pas moins nets : ils montrent que la culture en hématine est possible et que la quantité minima d'hématine indispensable est de beaucoup inférieure à la quantité minima indispensable de sang. On reviendra plus loin sur ce point, en discutant les résultats.

Comme d'assez grandes divergences se sont montrées entre les deux espèces étudiées, j'exposerai séparément les faits qui se rapportent à l'une et à l'autre.

Culture de *Strigomonas fasciculata* en présence d'hématine. Rappelons d'abord deux points importants : 1° *Strigomonas fasciculata* a besoin, pour effectuer sa croissance et se multiplier indéfiniment, de 1/20.000 de sang défibriné dans l'eau peptonée (voir page 80) ; 2° il est capable de se multiplier en bouillon bactériologique ordinaire grâce probablement à l'hématine (hémohématine + myohématine) que ce milieu renferme et qui est apportée par la macération de viande.

Ainsi qu'on l'a vu plus haut, l'hématine est diluée en eau peptonée de 1/1.000 à 1/640.000. Pour chaque dilution : 1/1.000, 1/2.000, 1/4.000, 1/5.000, 1/10.000, 1/20.000, 1/40.000, 1/80.000, 1/120.000, 1/160.000, 1/320.000, 1/640.000, on prépare 6 tubes par passage, 6 tubes-témoins en eau peptonée seule. Le premier ensemencement a lieu à partir d'une culture en bouillon ordinaire ; les ensemencements suivants à partir du tube renfermant la plus faible dose d'hématine où il s'est produit une culture.

Au premier passage, on a donc obtenu, de 1/1.000 à 1/80.000, une culture extrêmement riche avec voile.

Un anneau apparaît vers le huitième jour, puis rapidement un voile très épais. Ce voile, formé de flagellés confluents, renferme au minimum 600.000 individus par millimètre cube et souvent beaucoup plus. Si l'on détruit le voile et si l'on agite la culture de façon à obtenir une suspension à peu près homogène de *Leptomonas*, on peut compter, par exemple, jusqu'à 40.000 individus par millimètre cube, au cinquième passage, pour une dilution d'hématine de 1/80.000, le dixième jour de

TABLEAU VI. — Culture de *Str. fusciculata* en présence d'hématine.

DILUTIONS DE L'HÉMATINE														
PASSAGES	n°	1/1.000	1/2.000	1/4.000	1/5.000	1/10.000	1/20.000	1/40.000	1/80.000	1/120.000	1/160.000	1/320.000	1/640.000	0 ou ±
1 . . . .		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	±	±	±
2 . . . .		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	±	±	0	0	0
3 . . . .		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	±	0	0	0	0
4 . . . .		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	±	0	0	0	0
5 . . . .		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	±	0	0	0	0
6 . . . .		+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	±	0	0	0	0

++++, voile; ++, anneau; +, bonne culture; ±, culture pauvre; ±, culture non repiquable.

++++, voile; ++, anneau; +, bonne culture; ±, culture pauvre; ±, culture non repiquable.

la culture. A la dilution de  $1/120.000$ , on compte 3.000 individus par millimètre cube dans l'anneau et 600 dans la culture homogénéisée.

Au premier passage, à la dilution de  $1/160.000$ , il y a 250 flagellés par millimètre cube. A cette dilution, les repiquages ultérieurs sont impossibles.

L'hématine suffit donc à elle seule à provoquer la culture indéfinie de *Strigomonas fasciculata*. La quantité minima limite est aux environs de  $1/120.000$ . A  $1/80.000$ , les cultures sont extrêmement riches : à  $1/120.000$ , elles sont pauvres, mais repiquables. A  $1/160.000$ , elles ne sont pas repiquables. La limite exacte est donc entre  $1/120.000$  et  $1/160.000$ , mais plus près de  $1/120.000$ .

Culture de *Leptomonas ctenocephali* en présence d'hématine. — Le milieu utilisé est exactement le même que pour *Strigomonas fasciculata*; je n'y reviendrai pas. Mais les dilutions n'ont pas été poussées au delà de  $1/80.000$ . *Leptomonas ctenocephali* a en effet besoin de plus de sang et de plus d'hématine que *Strigomonas fasciculata*.

Mais, surtout, en ce qui concerne *Leptomonas ctenocephali*, une autre question pouvait être posée. On pouvait se demander si la nécessité, pour ce flagellé, d'une quantité relativement élevée ( $1/500$ ) de sang n'était pas l'indice de la nécessité d'un autre facteur que l'hématine (facteur « X » pour les bactériologistes), d'un facteur qui aurait pu avoir, par exemple, les caractères du « facteur V » indispensable aux bactéries hémophiles.

Les expériences faites avec l'hématine montrent qu'il n'en est rien et que, comme *Strigomonas fasciculata*, *Leptomonas ctenocephali* n'a besoin, en dehors des protides, que de l'élément indispensable apporté par l'hématine.

Le premier ensemencement est fait à partir d'une culture jeune (quinze à vingt jours) en eau peptonée sang. On prélève très soigneusement le voile ou l'anneau à la partie supérieure du liquide pour introduire le moins de sang possible dans les tubes d'expérience.

Il y a, pour chaque essai, une série de témoins en eau peptonée seule. Disons tout de suite qu'il ne s'y est jamais produit la moindre culture.

Au premier repiquage, les cultures ont débuté vers le trente-septième jour dans les tubes renfermant les dilutions de 1/1.000, 1/2.000, 1/4.000, 1/6.500, 1/10.000, 1/20.000, 1/40.000. Elles sont apparues, comme dans les milieux au sang, par formation de petites rosaces collées au verre. Le soixante-troisième jour, ces mêmes tubes présentaient un anneau riche de flagellés confluents; il s'est maintenu en s'accroissant légèrement jusqu'au cent deuxième jour, puis la culture a commencé de décliner, et, vers le cent dix-septième jour, il n'y avait plus que des rosaces de multiplication (rosaces de grégariens), comme au début, et un grand nombre de flagellés libres. Aucune trace de culture dans les témoins en eau peptonée.

TABLEAU VII. — Culture de *Leptomonas ctenocephali* en présence d'hématine.

PASSAGES n°	DILUTIONS DE L'HÉMATINE								
	1/1 000	1/2 000	1/4 000	1/6 500	1/10.000	1/20.000	1/40.000	1/80.000	0
1 (63 <sup>e</sup> jour).	++	++	++	++++	++++	++++	++++	+	0
2 (63 <sup>e</sup> jour).	++	++	++	++++	++++	++++	++++	+	0
3 (75 <sup>e</sup> jour).	++	++	++	++++	++++	++++	++++	0	0
4 (70 <sup>e</sup> jour).	++	++	++	++++	++++	++++	++++	0	0
5 (80 <sup>e</sup> jour).	++	++	++++	++++	++++	++++	++++	0	0
6 (45 <sup>e</sup> jour).	++	++	++++	++++	++++	++++	++++	0	0
++++, culture en voile; ++, culture en anneau; +, bonne culture; $\frac{+}{-}$ , culture non repiquable.									

Le deuxième repiquage a subi la même évolution que le premier, du trentième au soixante-dix-huitième jour. Le stade le plus riche s'est produit vers le soixante-cinquième jour et manifesté par un anneau compact et un léger voile. Témoins : 0.

Aux troisième, quatrième et cinquième passages, la même



régularité s'est manifestée dans la marche des cultures; apparition du vingt-cinquième au trente-cinquième jour; maximum du soixantième ou quatre-vingtième au quatre-vingt-dixième ou centième jour, puis déclin vers le cent dixième. De même au sixième passage. Les témoins en eau peptonée ont toujours été négatifs.

Les résultats de cette expérience ont donc été les suivants : l'hématine peut remplacer le sang dans l'eau peptonée et permettre la culture de *Leptomonas ctenocephali* même à la dilution de 1/40.000. Les cultures apparaissent plus lentement qu'en présence du sang, mais elles y sont abondantes, régulières et indéfinies.

*Comparaison entre les cultures en présence d'hématine et les cultures en présence de sang.* — L'hématine est donc capable de remplacer le sang dans les milieux peptonés et de permettre, par là-même, la culture indéfinie de *Leptomonas ctenocephali*, *Strigomonas fasciculata*. Les résultats obtenus, d'une part en utilisant le sang, d'autre part en utilisant l'hématine, sont tout à fait comparables. Pour *Strigomonas fasciculata*, il faut, au minimum, 1/20.000 de sang, 1/120.000 d'hématine; pour *Leptomonas ctenocephali*, 1/500 de sang, 1/40.000 d'hématine. C'est pour celui-là la proportion de 1 à 6, pour celui-ci de 1 à 8. Théoriquement, étant donnée la proportion d'hématine dans le sang, ces rapports devraient être beaucoup plus grands, environ 1/200. L'écart observé est dû, au moins en partie, à ce qu'une certaine quantité d'hématine a précipité dans la solution neutre ou très légèrement alcaline de peptone (voir p. 89) et qu'alors les dilutions d'hématine réellement actives (en solution dans le milieu) étaient en réalité beaucoup plus faibles que celles qui avaient été établies.

Il n'en ressort pas moins des expériences ci-dessus que l'hématine est bien l'élément actif du sang. Etant donné le fait bien démontré que, en ce qui concerne la culture des bactéries hémophiles, l'activité de l'hématine est liée au fer qu'elle contient (les porphyrines sont en effet sans action), il m'a paru intéressant de chercher à remplacer l'hématine par des solutions de sels de fer. J'ai utilisé la « peroxydase artificielle » de Wolff.

## L'ÉLÉMENT ACTIF DE L'HÉMATINE : LE FER ACTIF.

La « peroxydase artificielle » de Wolff est une combinaison en proportions définies de ferrocyanure de potassium et de sulfate ferreux. D'après J. Wolff (1910), on la prépare de la façon suivante :

Faire bouillir de l'eau distillée. Faire deux solutions :

a) 100 cent. cubes d'eau distillée + 75 milligrammes de ferrocyanure de potassium ;

b) 400 cent. cubes d'eau distillée + 71 milligr. 2 de sulfate ferreux cristallisé (+ H<sup>2</sup>O).

Mélanger *a* et *b*.

On obtient une solution colloïdale bleu de Prusse.

Cette solution donne une réaction de la benzidine — eau oxygénée fortement positive (réaction des peroxydases).

Dans une première expérience, j'ai recherché si la culture de *Strigomonas fasciculata* est possible dans un milieu composé par de l'eau peptonée additionnée de « peroxydase » à diverses concentrations ; si la « peroxydase » peut, en somme, remplacer l'hématine dans les solutions peptonées.

La peroxydase de Wolff *a*, dans les expériences, été stérilisée par filtration sur bougie Chamberland. La filtration ne lui fait pas perdre son activité peroxydasique.

A 6 cent. cubes d'eau peptonée, on ajoute respectivement la peroxydase de façon à avoir des concentrations de 1/7, 1/14, 1/25, 1/70, 1/140 de « peroxydase ». On ensemence à partir d'une culture en eau peptonée seule. On sait que *Strigomonas fasciculata* ne peut être entretenu en eau peptonée seule, mais qu'on peut obtenir 1 ou 2 repiquages à partir d'une culture en eau peptonée-sang. C'est une de ces cultures en eau peptonée qu'on utilise donc pour le premier ensemencement. On ensemence chaque tube avec II à III gouttes.

Dès le premier passage, les cultures furent plus que médiocres (voir tableau VIII). A la concentration de 1/140, on a des cultures très pauvres ( $\pm$ ) du quatrième au vingtième jour. A cette même concentration, au deuxième passage, tenté malgré la pauvreté du premier, résultats entièrement négatifs. Les tubes ont été gardés en observation pendant plus de deux mois au cours desquels aucun changement ne s'est produit.

TABLEAU VIII. — Essai de culture de *Strigomonas fasciculata* en eau peptonée + peroxydase artificielle de Wolff.

PEROXYDASE DE WOLF (pour 6 cent. cubes d'eau peptonée) en centimètres cubes	RÉACTION de la benzidine H <sup>2</sup> O <sup>2</sup>	PASSAGES N°	
		1	2
0,05 . . . . .	0	±	0
0,1 . . . . .	0	±	0
0,25 . . . . .	0	± ou +	0
0,50 . . . . .	0	+ ou ++	0
1 . . . . .	0	+ ou ++	0

A la concentration de 1/70 : mêmes résultats que ci-dessus, à l'exception d'un tube où s'est produite une culture riche (+ + = anneau). Mais un ensemencement à partir de ce tube en eau peptonée + peroxydase 1/70 a donné des résultats totalement négatifs.

Dans les tubes contenant la peroxydase à 1/28, 1/14, 1/7, les résultats ont été, au premier passage, un peu meilleurs quoique irréguliers (v. tableau VIII). Mais le deuxième passage a été totalement négatif.

Cette expérience a été faite trois fois dans les mêmes conditions. Il n'y a jamais eu de culture au deuxième passage.

Les résultats de cette tentative sont donc très nets : il est impossible de cultiver *Strigomonas fasciculata* en eau peptonée additionnée de « peroxydase » de Wolff, même à des concentrations élevées (1/7).

A quoi attribuer cet échec total ? On sait que la « peroxydase » de Wolff donne une réaction de la benzidine — eau oxygénée fortement positive, réaction qui démontre son activité peroxydasique. La « peroxydase » introduite dans l'eau peptonée conserve-t-elle son activité ? L'expérience montre que non : le mélange en eau peptonée + peroxydase ne donne, à aucune concentration, une réaction benzidine-eau oxygénée positive. Telle pouvait donc être la cause de l'échec : la peroxydase,

ayant perdu son activité en eau peptonée, ne pouvait provoquer la culture des *Leptomonas*.

Sur le conseil de M. Schœn, j'ai essayé de stabiliser la peroxydase de Wolff par un colloïde protecteur.

On peut constater en effet que si l'on ajoute à la peroxydase  $1/5$ ,  $1/10$ ,  $1/20$  ou même moins de gélatine ou de gomme arabique, par exemple, la peroxydase garde son activité une fois introduite en eau peptonée; la solution de gélatine ou de gomme arabique, en eau distillée, ne donne pas cette réaction. Dans ces expériences, la peroxydase stabilisée est stérilisée à l'autoclave; le chauffage, dans ces conditions, ne lui enlève pas son activité.

*Essai de stabilisation de la « peroxydase de Wolff » par la gélatine.* — Je me suis d'abord assurée :

1° Que la solution de gélatine (pour l'échantillon de gélatine utilisé) en eau distillée ne donnait pas la réaction des peroxydases ;

2° Que la « peroxydase » de Wolff, en présence de gélatine, conserve son activité peroxydasique en eau peptonée.

Ces deux points acquis, les expériences ont été faites de la façon suivante : on fait des solutions de gélatine dans la peroxydase artificielle, à  $1/25$ ,  $1/50$ ,  $1/75$ ,  $1/100$ ,  $1/150$ ,  $1/200$ , c'est-à-dire 1 gramme de gélatine en solution dans 25, 50, 75, etc. cent. cubes de peroxydase de Wolff. De chacune de ces solutions, on introduit en eau peptonée des quantités variables :  $1/4$ ,  $1/2$ , 1 cent. cube, 2 cent. cubes de peroxydase + gélatine (les diverses concentrations de gélatine) dans 6 cent. cubes d'eau peptonée. Il y a des témoins en eau peptonée + gélatine et en eau peptonée seule. L'ensemencement est fait à partir d'une culture en peptone seule.

Au premier repiquage on a obtenu :

Peroxydase + gélatine ( $1/25$ ), $1/2$ cent. cube . . . . .	++
Peroxydase + gélatine ( $1/25$ ), 1 cent. cube . . . . .	++
Peroxydase + gélatine ( $1/25$ ), 2 cent. cubes. . . . .	++
Peroxydase + gélatine ( $1/50$ ), $1/2$ cent. cube. . . . .	±
Peroxydase + gélatine ( $1/50$ ), 1 cent. cube . . . . .	+
Peroxydase + gélatine ( $1/50$ ), 2 cent. cubes. . . . .	+
Peroxydase + gélatine ( $1/75$ ), $1/2$ cent. cube. . . . .	±
Peroxydase + gélatine ( $1/75$ ), 1 cent. cube . . . . .	0
Peroxydase + gélatine ( $1/75$ ), 2 cent. cubes. . . . .	+



Peroxydase + gélatine (1/100), 1/2 cent. cube. . . . .	+
Peroxydase + gélatine (1/100), 1 cent. cube. . . . .	++
Peroxydase + gélatine (1/100), 2 cent. cubes. . . . .	++
Peroxydase + gélatine (1/150), 1/2 cent. cube. . . . .	++
Peroxydase + gélatine (1/150), 1 cent. cube. . . . .	+++
Peroxydase + gélatine (1/150), 2 cent. cubes. . . . .	++
Peroxydase + gélatine (1/200), 1/2 cent. cube. . . . .	±
Peroxydase + gélatine (1/200), 1 cent. cube. . . . .	±
Peroxydase + gélatine (1/200), 2 cent. cubes. . . . .	±
Témoins . . . . .	+ ou ±

Les témoins en eau peptonée + gélatine (en eau distillée) ont donné tous à peu près les mêmes résultats que les tubes d'expériences renfermant de la « peroxydase ».

Comme on le voit, les résultats sont loin d'être bons, et surtout sont irréguliers. Cependant, un deuxième repiquage a été tenté à partir des tubes où s'était produite la meilleure culture, c'est-à-dire les tubes renfermant 1/2, 1 ou 2 cent. cubes de gélatine à 1/25 dans la peroxydase. Au deuxième passage, il ne s'est produit nulle part de culture.

TABEAU IX. — Essai de culture de *Strigomonas fasciculata* en eau peptonée additionnée de peroxydase de Wolff stabilisée par la gélatine. W = peroxydase de Wolff.

	QUANTITÉ DE « PEROXYDASE » stabilisée par la gélatine					
	Premier repiquage			Deuxième repiquage		
	1/2 c. c.	1 c. c.	2 c. c.	1/2 c. c.	1 c. c.	2 c. c.
W + gélatine 1/25 . . . . .	+	+	+	0	0	±
W + gélatine 1/50 . . . . .	±	+	+	0	0	0
W + gélatine 1/75 . . . . .	±	0	+	0	0	0
W + gélatine 1/100 . . . . .	±	+	+	0	0	0
W + gélatine 1/150 . . . . .	+	++	+	0	0	0
W + gélatine 1/200 . . . . .	±	±	±	0	0	0
Gélatine 1/25 . . . . .	±	±	+	0	0	0

Une deuxième tentative a donné les mêmes résultats totalement négatifs.

Comment expliquer cet échec total? La gélatine cependant permettait bien à la peroxydase de conserver son activité en eau peptonée. *Strigomonas fasciculata* liquéfie la gélatine. Il est probable que, dans ces expériences, la gélatine (il y en a très peu) est rapidement attaquée et liquéfiée par la trypsine qui diffuse à partir des flagellés dans le milieu de culture. La gélatine perdrait, naturellement, par suite de cette digestion, son pouvoir protecteur.

*Essai de stabilisation de la peroxydase de Wolff par la gomme arabique.* — Deux séries d'expériences ont eu lieu avec deux échantillons différents de gomme. Elles seront exposées successivement.

1° *Echantillon de gomme arabique n° 1.*

a) *Culture de Strigomonas fasciculata* en présence de gomme en solution dans l'eau distillée. Cet échantillon de gomme arabique en solution dans l'eau distillée donnait une réaction des peroxydases positive. Une première expérience a donc été faite pour voir si la gomme arabique seule pouvait provoquer la culture de *Strigomonas fasciculata*.

La gomme arabique est diluée à 1/5 dans l'eau distillée. On l'introduit dans l'eau peptonée de manière à obtenir des dilutions de 1/30, 1/45, 1/60, 1/90, 1/180, 1/450, 1/900. Ensemencement comme toujours à partir d'une culture en eau peptonée. On a obtenu les résultats suivants :

*Premier repiquage :*

Gomme arabique à 1/900, 1/450, 1/180, 1/90 . . . . .	0
Gomme arabique à 1/60 . . . . .	Culture pauvre.
Gomme arabique à 2/45, 1/30. . . . .	Cultures moyennes.
Témoins (eau peptonée seule). . . . .	0

*Deuxième repiquage :*

Gomme arabique à 1/900, 1/450, 1/180, 1/90 . . . . .	0
Gomme arabique à 1/60 . . . . .	±
Gomme arabique à 1/45, 1/30 . . . . .	++

Aux 3<sup>e</sup>, 4<sup>e</sup>, 5<sup>e</sup> passages, résultats sensiblement les mêmes. Voir le tableau X.

TABLEAU X. — Culture de *Strigomonas fasciculata* + gomme arabique (échantillon n° 1) à diverses concentrations.

E. D. + GOMME ARABIQUE 5	PASSAGES N°					
	1	2	3	4	5	6
1/30. . . . .	++ ou +	++	++ ou +	++	++	++
1/45. . . . .	++ ou +	++ ou +	+	+	+	+
1/60. . . . .	±	±	0	0	0	0
1/90. . . . .	0	0	0	0	0	0
1/180 . . . . .	0	0	0	0	0	0
1/450 . . . . .	0	0	0	0	0	0
1/900 . . . . .	0	0	0	0	0	0
Témoins (eau peptonée). . .	0	0	0	0	0	0

Cette expérience montre que la culture de *Strigomonas fasciculata* est possible en présence d'un échantillon de gomme arabique donnant la réaction des peroxydases. Elle montre qu'une peroxydase végétale est capable de permettre la culture d'un Trypanosomide et de remplacer le sang ou l'hématine.

b) Cultures en présence de « peroxydase » stabilisée par l'échantillon de gomme n° 1. — Bien que la culture de *Strigomonas fasciculata* se montrât possible en présence de la seule gomme arabique (quoique, il est vrai, à de fortes concentrations), je n'en ai pas moins essayé de l'utiliser pour stabiliser la peroxydase de Wolff et d'étudier les cultures ainsi obtenues.

Trois concentrations de gomme arabique dans la peroxydase : 1/5, 1/10, 1/20. Des quantités diverses de ces solutions sont introduites dans 6 cent. cubes d'eau peptonée = 1 c. c. 1/2, 1 cent. cube, 1/2, 1/4, 1/10, 1 c. c. 20. Voici le détail des résultats.

### Premier repiquage :

a) Peroxydase stabilisée par la gomme arabique à 1/20 :

- 0 c. c. 5 et 0 c. c. 1. Pas de culture ou culture très pauvre ( $\pm$ )
- 0 c. c. 25 . . . . . Culture pauvre ( $\pm$ ).
- 0 c. c. 5. . . . . Culture pauvre (+).
- 1 et 1 c. c. 5. . . . . Bonnes cultures, anneau (++).

b) Peroxydase stabilisée par la gomme à 1/10 :

- 0 c. c. 5 et 0 c. c. 1 . . . . . Culture pauvre ( $\pm$ ).
- 0 c. c. 25 . . . . . Culture (+).
- 0 c. c. 5, 1 cent. cube, 1 c. c. 5. Bonne culture, anneau (++).

c) Peroxydase stabilisée par la gomme à 1/5 :

Mêmes résultats que ci-dessus.

N. B. — Dans tous les tableaux qui concernent les cultures en présence de peroxydase, sont donnés en regard les résultats avec la peroxydase stabilisée par la gomme et avec la gomme seule.

TABLEAU XI. — Premier passage de *Strigomonas fasciculata* en eau peptonée + peroxydase de Wolff stabilisée par la gomme arabique (échantillon n° 1).

	RÉACTION benzidine H <sup>2</sup> O <sup>2</sup>	QUANTITÉS INTRODUITES DANS 6 CENT. CUBES D'EAU PEPTONÉE						
		0	0 c.c. 5 et 0 c.c. 1	0 c.c. 25	0 c.c. 5	0 c.c. 75	1 c.c.	1 c.c. 5
W + G. A. 1 p. 20. .	+	0	±	+	+	++	++	++++
W + G. A. 1 p. 10. .	+	0	±	+	++	++	++	++++
W + G. A. 1 p. 5. .	+	0	±	+	++	++	++	++++
E. D. + G. A. 1 p. 20.	+	0	0	0	0	+	+	++

W, peroxydase de Wolff; E. D., eau distillée; G. A., gomme arabique; +++++, culture en voile; ++, culture en anneau; +, culture; ±, mauvaise culture.

### Deuxième repiquage :

Il suffit de consulter le tableau n° XII pour voir qu'au deuxième repiquage on a obtenu de bonnes cultures (++, anneau) avec les trois concentrations en gomme à condition d'en fournir au moins 0 c. c. 5 pour 6 cent. cubes. Comparer les résultats avec ceux obtenus dans les expériences avec la gomme seule (tableau X).



Je ne donne pas les résultats successifs des 3<sup>e</sup>, 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> passages; ils ont été sensiblement les mêmes que ceux du 2<sup>e</sup>. Voici, dans le tableau XIII, les résultats du 6<sup>e</sup>, qui fut le dernier de cette série.

Cette expérience, qui a comporté six passages, a montré que la culture de *Strigomonas fasciculata* est possible en présence d'une « peroxydase artificielle » stabilisée par un colloïde protecteur à condition d'en utiliser une proportion convenable = 1/3 au moins.

Mais dans cette expérience, la peroxydase a été stabilisée par un colloïde (gomme arabique) doué lui-même d'une certaine activité peroxydasique, et capable, on l'a vu, de provoquer la culture de *Strigomonas fasciculata* (v. page 100 et tableaux X et XI). Mais, à l'examen des résultats, on se rend aisément compte du fait que la peroxydase est stabilisée, et que la quantité de gomme arabique qu'elle contient ne permettrait pas à elle seule la culture.

TABLEAU XII. — Deuxième passage de *Strigomonas fasciculata* en eau peptonée + peroxydase de Wolff stabilisée par la gomme arabique (échantillon n° 1).

	RÉACTION benzidine H <sup>2</sup> O <sup>2</sup>	QUANTITÉS INTRODUITES DANS 6 CENT. CUBES D'EAU PEPTONÉE						
		0	0 c. c. 05 et 0 c. c. 1	0 c. c. 25	0 c. c. 5	0 c. c. 75	1 c. c.	1 c. c. 5
W + G. A. 1 p. 20 .	+	0	0	±	++++	++++	++++	++++
W + G. A. 1 p. 10 .	+	0	±	++	++++	++++	++++	++++
W + G. A. 1 p. 5. .	+	0	±	++++	++++	++++	++++	++++
E. D. + G. A. 1 p. 5.	+	0	0	0	0	±	++	++++

Nota : Même légende que tableau XI.

L'action propre de la peroxydase est donc déjà évidente. Elle est mieux démontrée par l'expérience suivante faite avec un échantillon de gomme dénué d'activité peroxydasique.

c) Cultures avec la « peroxydase » stabilisée par l'échantillon

de gomme n° 2. — 1° Cet échantillon de gomme arabique ne donne pas la réaction des peroxydases.

TABEAU XIII. — Sixième passage de *Strigomonas fasciculata* en eau peptonée + peroxydase de Wolff stabilisée par la gomme arabique (échantillon n° 1).

	RÉACTIONS benzidine $H_2O_2$	QUANTITÉS INTRODUITES DANS 6 CENT. CUBES D'EAU PEPTONÉE						
		0	0 c. c. 05 et 0 c. c. 1	0 c. c. 25	0 c. c. 5	0 c. c. 75	1 c. c.	1 c. c. 5
W + G. A. 1 p. 20 .	+	0	0	0	+	++	++++	++++
W + G. A. 1 p. 40 .	+	0	0	+	++	++	++++	++++
W + G. A. 1 p. 5. .	+	0	0	+	++	++	++++	++++
E. D + G. A. 1 p. 5.	+	0	0	0	0	+	+	++

Nota : Même légende que tableau XI.

2° Tous les essais pour cultiver *Strigomonas fasciculata* en présence de cette gomme seule ont échoué. Expériences tout à fait semblables à celles relatées page 100).

La peroxydase a été stabilisée avec la gomme à 1/20. L'expérience a été arrêtée au 8<sup>e</sup> passage. Les résultats sont exposés dans le tableau XIV (v. p. 104).

On peut résumer ce dernier essai de la façon suivante : la peroxydase de Wolff, stabilisée par la gomme arabique (échantillon n° 2), a permis des cultures abondantes et repiquables de *Strigomonas fasciculata*. La gomme arabique utilisée dans cette expérience ne donnait pas la réaction des peroxydases et ne permettait pas la culture de *Strigomonas fasciculata*.

*Influence de la réaction du milieu sur les cultures en présence de peroxydase.* — Pensant que la concentration du milieu en ions H pouvait avoir une influence sur les conditions de la stabilisation de la « peroxydase » par la gomme arabique, j'ai fait des essais de culture de *Strigomonas fasciculata* en présence de peroxydase de Wolff à des pH divers.

La peroxydase a été stabilisée avec la gomme arabique

échantillon n° 2. L'eau peptonée a été ajustée à divers  $pH$ . L'introduction de la peroxydase + gomme arabique aux concentrations où elle était employée ne changeait pas le  $pH$ . La détermination des  $pH$  a été faite colorimétriquement.

TABLEAU XIV. — Culture de *Strigomonas fasciculata* en eau peptonée + peroxydase artificielle de Wolff stabilisée par la gomme arabique (échantillon n° 2).

PASSAGES n°	RÉACTION benzidine $H^2O^2$	QUANTITÉS DU MÉLANGE W + G. A. 1/20 ajoutés à 6 cent. cubes d'eau peptonée						
		0	0 c. c. 05 et 0 c. c. 1	0 c. c. 25	0 c. c. 5	1 c. c.	2 c. c.	3 c. c.
1 . . . .	+	0	+	+	++	++	++++	++++
2 . . . .	+	0	+	+	++	++++	++++	++++
3 . . . .	+	0	±	+	++	++++	++++	++++
4 . . . .	+	0	+	+	++	++++	++++	++++

Nota : Légende voir tableau XI.

Ont été étudiés les milieux à  $pH = 4,5 - 5,5 - 6,5 - 7,2 - 7,5$ . Les résultats ont été les mêmes partout, quelle que soit la réaction du milieu. Trois repiquages seulement ont été faits à ces divers  $pH$ . Puis l'expérience a été continuée seulement à  $pH = 7,2$  jusqu'au huitième repiquage (se reporter à la page 103). Il est superflu d'entrer dans le détail des expériences qui ont été semblables à celles déjà décrites page 100, et qui ont donné les mêmes résultats.

De ces expériences, dans lesquelles j'ai essayé de substituer à l'hématine une combinaison colloïdale de fer afin de rechercher le rôle possible de celui-ci, on peut conclure :

1° Que la « peroxydase » de Wolff peut permettre la culture de *Strigomonas fasciculata* en eau peptonée à condition toutefois qu'elle soit au préalable stabilisée par un colloïde protecteur, grâce auquel elle conserve son activité peroxydasique en présence de peptone. Les cultures ne sont jamais aussi riches qu'avec l'hématine, sans doute le fer n'est-il pas fourni aux

TABLEAU XV. — Comparaison entre les essais de culture de *Strigomonas fasciculata* en eau peptonée + peroxydase de Wolff stabilisée par la gomme arabique n° 2 d'une part, et, d'autre part, en eau peptonée + gomme arébique en eau distillée.

	RÉACTIONS benzidine H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	QUANTITÉS INTRODUITES DANS 6 CENT. CUBES D'EAU PEPTONÉE						
		0 c. c. 05 et 0 c. c. 1	0 c. c. 25	0 c. c. 5	1 c. c.	2 c. c.	3 c. c.	0
W + G. A. 4 p. 20 . .	+	±	+	++	++++	++++	++++	0
E. D. + G. A. 4 p. 20.	0	0	0	0	0	±	0	0

Nota : Légende voir tableau XI.

flagellés sous la forme la plus favorable. L'étude plus spéciale du rôle du fer sort des limites de ce travail. Le choix du colloïde protecteur semble avoir une certaine importance puisque, des deux avec lesquels j'ai expérimenté, un seul, la gomme arébique, a permis d'obtenir des résultats positifs.

2° Que certaines peroxydases végétales sont capables de remplacer le sang ou l'hématine pour la culture de *Strigomonas fasciculata*. Ceci n'est d'ailleurs pas pour étonner. D'après Kuhn, Hand et Florkin (1934), la partie active des peroxydases végétales est une combinaison porphyrine-fer (Eisenporphyrin-verbindung).

## V. — Comparaison avec les bactéries hémophiles.

Il est très intéressant de constater que la question de la nutrition des Trypanosomides se développe parallèlement à celle de la nutrition des Bactéries parasites du groupe du bacille de Pfeiffer. C'est pourquoi je n'ai pas craint de m'étendre un peu longuement sur cette partie du travail et de faire une comparaison entre Bactéries et Protozoaires parasites. Donnons d'abord un bref résumé de ce que l'on sait des particularités de la nutrition chez ces Bactéries.

Pfeiffer (1892) et les tout premiers auteurs qui se sont inté-



ressés à la question à sa suite (Huber 1893, Nasstjukoff 1893, Voges 1894, Capaldi 1896, Cantani 1897) découvrent le rôle important joué par le sang dans le déterminisme des cultures du bacille de Pfeiffer. Pfeiffer avait établi le rôle essentiel du sang, l'absence de culture en atmosphère totalement privée d'oxygène, ou en atmosphère de  $\text{CO}_2$ , ou de  $\text{H}_2$ , l'action nettement positive de l'hémoglobine portée à l'ébullition. De cette dernière constatation, il conclut que le fer devait jouer un rôle primordial.

A la suite de ces recherches fondamentales, de nombreux chercheurs ne tardent pas à approfondir le problème tout en mettant en relief sa complexité. Certains d'entre eux, Cantani (1901), Neisser (1903), Williams et collaborateurs (1914), Williams et Povitzky (1920-1921), Reith (1923) obtiennent la culture de *B. influenzae* (diverses souches) dans des milieux dépourvus de sang, en présence de bactéries vivantes (staphylocoques, gonocoques, bacille diphtérique). D'autres, Luerssen (1904), dans des milieux dépourvus de sang avec des bactéries tuées (*B. prodigiosus*, *Staphylococcus albus*), ou Thjotta (1921), avec des émulsions ou extraits de bactéries. D'autres enfin, Grassberger (1897-1898), Ghon et Preyss (1902), Putnam et Gay (1920) n'obtiennent jamais de cultures positives en cultures mixtes, avec bactéries vivantes ou tuées, si le milieu de base ne renferme pas d'hématine.

Davis (1921) montre que des souches homologues ou hétérologues n'ont pas d'influence sur la culture du bacille de Pfeiffer, tandis que des souches d'hémophiles autres que le bacille de Pfeiffer ont un effet favorable sur sa culture.

Enfin, Ghon et Preyss (1902), Czaplewski (1902), Davis (1907) mettent en évidence qu'il suffit de très petites quantités d'hémoglobine pour que la culture se produise. Davis en particulier montre que 1/180.000 d'hémoglobine suffit pour l'obtention d'une culture pauvre, mais que, pour assurer l'entretien d'une souche, il en faut au moins 1/100.000 et pour la première fois est posée la question de l'hémoglobine = agent catalytique. D'ailleurs l'hémoglobine n'agit pas comme élément nutritif (Ghon et Preyss, Luerssen).

Cependant on découvre bientôt la nécessité de deux facteurs distincts, ayant chacun leurs propriétés propres qui ne seront

pas répétées ici puisqu'elles ont déjà été énumérées page 88 (Davis 1917-1921, Fildes 1921, Thjötta et Avery 1921). C'est donc dorénavant des facteurs X (présent dans l'hématine) et V (soi-disant vitaminique) qu'il sera question. Dès lors, un grand nombre d'auteurs recherchent les facteurs X et V dans toutes sortes de substances : facteur X dans le sang autoclavé (Rivers et Poole 1921), les œufs (Rivers 1921); facteur V dans l'extrait de levure, de pomme de terre (Rivers et Poole). Puis on montre que certaines bactéries ou mieux certaines souches ont besoin absolument des deux facteurs, tandis que d'autres n'ont besoin que du facteur X et certaines du facteur V.

Enfin, on cherche à analyser la nature du facteur X et à connaître son mode d'action. Dans cet ordre d'idées, c'est surtout Olsen, Fildes, Webster et Baudisch, Baudisch, Kopp et Eirund qui ont apporté des résultats intéressants. Fildes (1921), faisant des essais de culture avec l'hémoglobine, l'hématine et l'hématoporphyrine, est amené à conclure, l'hématoporphyrine ne donnant pas de culture, que la partie pigmentée des hématies, qui contient du fer, est nécessaire, que le pigment débarrassé de la fraction protéinique (hématine) est plus favorable que celui qui la contient (hémoglobine). Tous les essais de culture avec des composés du fer = citrate ferrique d'ammonium, divers sels de fer, fer dialysé, fer colloïdal, fer métallique ont échoué. Ces substances n'ont agi ni seules, ni en présence de la partie non colorée des globules sanguins (fraction protéinique), ni en présence d'hématoporphyrine.

Olsen (1920) étudie l'influence favorable de nombreux corps tous dérivés de l'hémoglobine (voir tableau XVI). Il fait des essais de cultures avec la « peroxydase artificielle » de Wolff, avec ou sans symbiose : tous échouent.

Webster et Baudisch (1925) remplacent le sang par du pentocyano-aquaferroate de sodium ou des oxydes de fer qui se montrent actifs pour les organismes qui n'ont besoin que du facteur X, mais non pour ceux qui ont besoin aussi du facteur V.

L. R. Anderson (1931) est amenée à conclure aussi que le facteur X indispensable à certaines souches de bactéries hémophiles est une peroxydase.

TABLEAU XVI. — Essai de culture de *B. influenzae* en présence de divers composés. D'après Olssen 1920.

	O EN combinaison lâche	RÉACTION galacol-H <sup>2</sup> O <sup>2</sup>	CULTURE du <i>B. influenzae</i>	
			avec symbiose	sans symbiose
Oxyhémoglobine . . . . .	+	+	+	+
Méthémoglobine . . . . .	—	+	+	+
Carboxyhémoglobine. . .	—	+	+	+
Hématine. . . . .		+	+	—
Hémine. . . . .		+	+	—
Hématoporphyrine. . .	—	—	—	—
Hémocyanine. . . . .	+	—	—	—
Bilirubine. . . . .	—	—	—	—
Chlorophylle. . . . .	—	—	—	—
Pyrrol . . . . .	—	—	—	—

Enfin, O. Baudisch (1932) montre que des oxydes de fer, plus spécialement  $\text{Fe}^2\text{O}^3$ , ayant subi un mode particulier de préparation sur lequel je ne peux insister ici, peuvent, aussi bien dans le bouillon que dans les milieux synthétiques, agir comme facteur X et remplacer le sang pour la culture de diverses bactéries parasites. Je ne peux m'étendre plus longuement sur les importantes et intéressantes conclusions de Baudisch relativement à l'activité des divers oxydes de fer liée à leur structure : à noter, en particulier, que Baudisch a obtenu des résultats positifs avec des oxydes ne donnant pas les réactions des peroxydases et des catalases.

Si maintenant on confronte les résultats obtenus avec les bactéries hémophiles et ceux obtenus avec les flagellés trypanosomides, on voit que les unes et les autres ont besoin de la

présence, dans les milieux de culture, d'un élément qui existe dans l'hématine. C'est le fer actif qui, dans l'hématine, joue le rôle important. Maintenant, comment le fer agit-il et sous quelle forme exacte doit-il être donné? C'est ce qu'on ne peut dire encore. Il est évident que les résultats obtenus de part et d'autre ne sont pas réguliers. Ainsi, on ne saurait affirmer que le fer agit comme peroxydase puisque certains échantillons de composés du fer utilisés par Baudisch et ne donnant pas la réaction des peroxydases ont permis des cultures de *B. levisepiticum* (v. tableau XVII). Il faut remarquer que les milieux peptonés (le bouillon nutritif ordinaire qui renferme de l'hématine ne doit pas être utilisé dans ces expériences délicates) renferment du fer puisqu'ils permettent la culture indéfinie de nombreuses espèces de bactéries et de protozoaires. Le fer étant un des constituants constants de la cellule vivante et un des éléments minéraux indispensables, les milieux peptonés renferment donc du fer assimilable en quantité suffisante pour assurer la nutrition des organismes libres. Le fait que les organismes parasites (bactéries hémophiles, flagellés trypanosomides) ne se multiplient que si l'on ajoute du fer aux solutions peptonées pourrait être interprété par l'hypothèse d'une concentration insuffisante en fer. Cette hypothèse ne me paraît pas plausible et il me semble plutôt que la nécessité du fer est liée, pour les bactéries comme pour les protozoaires, à la nécessité de fer d'une structure moléculaire particulière. Il se trouve que les sels de fer donnant la réaction des peroxydases, ainsi que les composés organiques qui la présentent, parfois aussi ceux donnant les réactions des catalases, peuvent permettre la culture des organismes parasites. Mais il me paraît imprudent de conclure pour le moment que l'activité du fer est liée à l'une de ces fonctions, peroxydasique ou catalasique. C'est ce qui semble ressortir du dernier travail de Baudisch.

Les sels de fer donnant la réaction des peroxydases ou celle des catalases sont actifs, mais des sels de fer dépourvus de l'une ou l'autre de ces fonctions peuvent l'être également. On peut donc en conclure que l'action du fer est liée à sa structure et que cette structure a besoin d'être protégée contre l'action nocive des milieux peptonés par un colloïde protecteur. La protection du fer actif est réalisée d'emblée dans les composés



TABLEAU XVII. — Culture de *B. hæmoglobinophilus canis*.  
D'après O. Baudisch 1932.

MILIEUX	PASSAGES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Bouillon (B) . . . . .	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B + sang. . . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B + Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> actif . . . . .	±	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B + Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> inactif. . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B + Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> de Eisencarbonyl (n° 1). . . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B + Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> de Eisencarbonyl (n° 1). . . . .	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B + Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> de Eisencarbonyl A. . . . .	+	+	+	±	±	—	—	—	—	—	—	—
B + Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> de Eisencarbonyl B. . . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ , bonne culture ; ± , culture irrégulière ; — , pas de culture.

organiques d'origine animale ou végétale dans lesquels le fer actif est combiné à une porphyrine (hémînes). C'est d'ailleurs l'hématine, et même plutôt sa combinaison avec une substance protidique comme la globine, qui constitue la forme la plus favorable sous laquelle le fer actif peut être donné aux organismes étudiés.

En effet, les cultures qu'on obtient avec le fer (peroxydase de Wolff) ne sont pas aussi abondantes que celles qu'on obtient avec l'hématine. Quant aux cultures en hématine, elles sont aussi abondantes que celles en hémoglobine pour *Strigomonas fasciculata* et moins abondantes pour *Leptomonas ctenocephali*. Il est possible que le fer n'ait pas été donné sous la forme la plus favorable. Mais l'étude du mode d'action du fer constitue à elle seule un problème particulier.

Cependant, la plupart des bactéries hémophiles ont besoin d'un autre élément, le facteur V, soi-disant vitaminique, de propriétés toutes différentes de celles du facteur X. Les flagellés

parasites jusqu'alors étudiés n'ont pas montré de besoin en facteur V. On peut raisonnablement supposer que, parmi ceux que l'on n'a pas encore étudiés à ce point de vue, il s'en trouvera quelques-uns qui ne pourront se multiplier qu'en présence d'un facteur V. Cela pourrait être le cas des *Leishmanies* et des *Trypanosomes* par exemple, dont les cultures sont soumises à un déterminisme plus complexe que celles des *Leptomonas* et des *Strigomonas*.

## VI. — Comparaison avec les Protozoaires libres.

### Conclusions.

Il est maintenant possible d'envisager comparativement la nutrition des Protozoaires libres et des Protozoaires parasites et d'essayer de définir en quoi ceux-ci diffèrent de ceux-là. Je n'exposerai pas en détail la question de la nutrition des protozoaires libres, qui a été récemment traitée par A. Lwoff. Je rappellerai simplement que A. Lwoff distingue parmi les protozoaires (*s. l.*) libres : les Chlorophytes (qui possèdent de la chlorophylle), les Leucophytes pourvus d'un ou plusieurs plastes et dépourvus de chlorophylle et les Protozoaires *s. s.* dépourvus de plastes et de chlorophylle. Les leucophytes *Polytoma uvella*, *Euglena gracilis* cultivée à l'obscurité (race physiologiquement stable), sont, le premier mésotrophe, le second métatrophe. Tous deux sont oxytrophes, c'est-à-dire ont besoin d'un aliment carboné organique indépendant (acides gras inférieurs).

Quant aux Protozoaires libres *s. s.*, le seul qui ait été étudié au point de vue du pouvoir de synthèse est le Cilié *Glaucoma piriformis* lequel a besoin, pour effectuer sa croissance et sa multiplication indéfinie, des produits de l'hydrolyse ménagée des protides. C'est le type des métatrophes. Les Trypanosomides, au point de vue de leur nutrition azotée, présentent les mêmes besoins que *Glaucoma piriformis*. Ce sont des métatrophes.

Mais seul, parmi les Trypanosomides étudiés jusqu'ici, *Strigomonas oncopelti* peut, comme *Glaucoma piriformis*, se multiplier indéfiniment dans les milieux peptonés seuls.

Il faut aux autres Trypanosomides, en plus de l'aliment azoté,

une quantité minime de sang. J'ai montré que, comme pour les bactéries parasites, le fer actif est indispensable aux Trypanosomides. On sait maintenant (Zeil et Hellström 1931) que la catalase du foie de cheval est un complexe porphyrine-fer. Il n'est donc pas étonnant que Zotta (1923) ait réussi à remplacer le sang, pour la culture de *Leptomonas pyrrhocoris*, par une catalase (catalase du foie de veau).

C'est le besoin en fer actif qui constitue la seule différence physiologique actuellement connue entre les Trypanosomides (*Strigomonas oncopelti* mis à part) et les Protozoaires libres (*Glaucoma piriformis*) et l'on peut dire que le parasitisme des Trypanosomides est défini biochimiquement, par rapport aux Protozoaires libres, par le besoin en fer actif. Il est probable que, chez les Bactéries hémophiles, le besoin en fer actif constitue également la marque du parasitisme. Des bactéries hémophiles ne peuvent, évidemment, vivre libres dans la nature, mais il est difficile de les comparer avec certitude à un type physiologique donné de bactéries libres; la morphologie qui, seule, permet de définir les affinités des organismes, ne peut être d'aucune utilité en ce qui concerne les bactéries de taille trop réduite, de structure relativement simple, présentant peu de caractères qui permettent d'établir ces affinités. Le fait que les récentes classifications — la classification américaine par exemple — tiennent le plus grand compte des caractères physiologiques, est bien le signe que les bactériologistes renoncent à grouper les bactéries selon leurs affinités naturelles.

Les recherches sur les Trypanosomides prennent une signification particulière grâce au fait qu'à côté des Trypanosomides, qui ne peuvent se passer de fer actif, il s'en trouve qui n'en ont pas besoin et se comportent comme le seul protozoaire libre dont le pouvoir de synthèse ait été défini.

Que représente ce besoin de fer actif? On sait que Keilin a découvert, chez tous les organismes aérobies, un pigment dont la partie active est une combinaison porphyrine-fer et qu'il a appelé le cytochrome. O. Warburg, qui a montré le rôle du fer dans les oxydations cellulaires, a défini comme ferment respiratoire la somme des combinaisons de fer à action catalytique qui se trouvent dans la cellule (Warburg, 1931). Le cytochrome fait partie de ces ferments respiratoires. On peut alors émettre



l'hypothèse que le besoin en fer actif des Trypanosomides est lié à une déficience en ferment respiratoire. Les Protozoaires libres ont la possibilité de faire la synthèse du ferment respiratoire qui leur est nécessaire. Les Trypanosomides ne pourraient faire la synthèse que d'une quantité insuffisante de ce ferment. Cette déficience, plus ou moins importante suivant les espèces, serait compensée, dans les milieux de culture, par la présence, en plus ou moins grande quantité de sang, d'hématine ou de fer actif.

## VII. — Résumé.

1° Les Trypanosomides sont des organes métatrophes, c'est-à-dire qui ont besoin, pour effectuer leur croissance et leur multiplication indéfinie, des produits de l'hydrolyse ménagée des protides (protéoses et polypeptides). Ils se comportent en cela comme les protozoaires métatrophes, dont le type est le Cilié libre *Glaucoma piriformis*.

2° *Strigomonas oncopelti* est le seul Trypanosomide étudié jusqu'ici qui puisse se contenter des solutions de peptones. A ce point de vue il ne diffère physiologiquement en rien de *Glaucoma piriformis*.

3° Il faut fournir aux autres Trypanosomides, en plus de l'aliment azoté, une certaine quantité de sang.

4° La quantité de sang indispensable est petite et variable suivant les espèces. Elle est de 1/20.000 pour *Strigomonas fasciculata*, de 1/5.000 pour *Leptomonas pyrrhocoris* (Zotta), de 1/500 pour *Leptomonas ctenocephali*.

5° L'hématine est la partie active du sang.

6° La catalase du foie de veau (Zotta), des peroxydases végétales peuvent remplacer le sang. Ces substances sont des combinaisons porphyrine-fer.

7° Le fer actif est l'élément actif de l'hématine et peut, à condition d'être stabilisé par un colloïde protecteur, remplacer le sang pour la culture des Trypanosomides.

8° Un parallèle entre la nutrition des Trypanosomides et celle des bactéries hémophiles montre qu'elle est caractérisée chez les uns comme chez les autres par le besoin en fer actif.

9° Une comparaison entre la nutrition des Protozoaires s. s.



libres et celle des Trypanosomides montre que celle-ci ne diffère de celle-là que par la nécessité de fer actif.

10° L'hypothèse est émise que ce besoin en fer actif est lié, chez les Trypanosomides et probablement aussi chez les bactéries hémophiles, à une déficience en ferment respiratoire.

#### TRAVAUX CITÉS

N.-B. — Pour tout ce qui concerne les Trypanosomides (isolement, culture, milieux), se rapporter au Livre de Nöller : *Die Züchtung der parasitischen Protozoen*, et pour tout ce qui concerne la nutrition des protozoaires à la Monographie de A. Lwoff : *Recherches biochimiques sur la Nutrition des Protozoaires*.

- ANDERSON LUCILE (R.). *Amer. Journ. of Hyg.*, **43**, 1931, p. 164 à 200.  
 AVERY et MORGAN. *Journ. Exp. Med.*, **39**, 1924, p. 289; *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **21**, 1923-1924, p. 59.  
 BAUDISCH. *Biochemische Zeitschrift*, **245**, 1932, p. 265.  
 BAUDISCH et DUBOS. *Biochemische Zeitschrift*, **245**, 1932, p. 278.  
 BAYON. *Proc. Roy. Soc., série B.*, **85**, 1912, p. 482.  
 CANTANI. *Centralbl. f. Bakt., I. Orig.*, **22**, 1897; *Ztschr., f. Hyg.*, **36**, 1901.  
 CAPALDI. *Centralbl. f. Bakt., I. Orig.*, **20**, 1896.  
 CHATTON. *C. R. Soc. Biol.*, **81**, 1918, p. 346; *C. R. Soc. Biol.*, **81**, 1918 a, p. 714; *C. R. Soc. Biol.*, **81**, 1918 b, p. 774; *Bull. Soc. Path. Exot.*, **12**, 1919, p. 313.  
 CLEVELAND et COLLIER. *Amer. Journ. of Hyg.*, **12**, 1930, p. 614 et 623.  
 CZAPLEWSKI. *Centralbl. f. Bakt., I. Orig.*, **32**, 1902, p. 667.  
 DAVIS. *Journ. Infect. Dis.*, **4**, 1907, p. 73; *Journ. Infect. Dis.*, **21**, 1917, p. 392; *Journ. Infect. Dis.*, **29**, 1921, p. 171, 178 et 187; *Journ. Amer. Med. Assoc.*, **77**, 1921 a, p. 683.  
 DRBOHLAV. *Amer. Journ. of Hyg.*, **5**, 1923, p. 580 et 621.  
 EFFRONT. *Les Catalyseurs Biochimiques*. Paris, Dunod, Editeur, 1914.  
 EIRUND. *Centralbl. f. Bakt., I. Orig.*, **111**, 1929.  
 FANTHAM. *Brit. Med. Journ.*, **2**, 1912, p. 1196.  
 FILDES. *Brit. Journ. Exper. Path.*, **1**, 1920, p. 129; *Brit. Journ. Exper. Path.*, **2**, 1921, p. 16; *Brit. Journ. Exper. Path.*, **3**, 1922, p. 210; *Brit. Journ. Exper. Path.*, **4**, 1923, p. 205; *Brit. Journ. Exper. Path.*, **5**, 1924, p. 69.  
 FRAENKEL. *Hygien. Rundschau*, **19**, 1909, p. 57.  
 FRANCHINI. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **16**, 1923, p. 41 et 256.  
 GALLIARD. *C. R. Soc. Biol.*, **107**, 1931, p. 148.  
 GHON et PRYSS. *Centralbl. f. Bakt., I. Orig.*, **32**, 1902, p. 90; *Centralbl. f. Bakt. I. Orig.*, **35**, 1904, p. 531.  
 GLASER. *Amer. Journ. Trop. Med.*, **6**, 1926, p. 205.  
 GRASSBERGER. *Ztschr. f. Hyg.*, **25**, 1897; *Centralbl. f. Bakt., I. Orig.*, **23**, 1898.  
 HAGEMEISTER. *Ztschr. f. Hyg.*, **77**, 1914, p. 227.  
 HUBER. *Ztschr. f. Hyg.*, **15**, 1893.  
 IRIKURA. Saikinjakuzasshi. Ref. in *Centralbl. f. Bakt.*, **40**, 1907, p. 849, et *Arch. f. Schiff. u. Tropenhyg.*, **13**, 1909, p. 383.

- KEILEX. *C. R. Soc. Biol.*, 1927. (Réunion plénière 1927.)
- KUHN, HAND et FLORKIN. *Zeitsch. f. Physiol. Chemie*, 201, 1931, p. 255.
- LAVERAN et FRANCHINI. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 12, 1919, p. 310 et 665.
- LAVERAN et PETIT. *C. R. Soc. Biol.*, 68, 1910, p. 114 et 276.
- LEGROUX et JIMENEZ. *C. R. Acad. Sciences*, 173, 1921, p. 1423.
- LUERSEN. *Centralblat f. Bakt. I. Orig.*, 35, 1904, p. 434.
- LWOFF (André). « Recherches biochimiques sur la nutrition des Protozoaires ». *Monographies de l'Institut Pasteur*, 1932, Paris, Masson, Editeur.
- LWOFF (Marguerite). *C. R. Soc. Biol.*, 99, 1928, p. 472 et 1133; 100, p. 240; *Soc. Path., Exot.*, 22, 1929, p. 217; *C. R. Soc. Biol.*, 104, 1930, p. 666; 105, 1930, p. 835; *C. R. Soc. Biol.*, 107, 1931, p. 447, 1234 et 1428; *C. R. Biol.*, 110, 1932, p. 891.
- LWOFF (A.) et LWOFF (M.). *Bull. Biol. France-Belgique*, 65, 1931, p. 170.
- LWOFF (M.) et LWOFF (A.). *Protistologica XXVI* (*Arch. Zool. expér. et génér.*), N. R., 71, 1931, p. 21.
- MATHIS. *C. R. Soc. Biol.*, 61, 1906, p. 530; *C. R. Soc. Biol.*, 71, 1911, p. 538.
- MESNIL. In LAVERAN et MESNIL, Trypanosomes et Trypanosomiasis, Paris, Masson, 1912 (v. la note de la page 950).
- MIJAJIMA. *Philippine Journ. of Science*, 2, 1907, p. 83.
- NASSTJUKOFF. *Centralbl. f. Bakt.*, 14, 1893.
- NEISSER. *Deutsch. med. Wochschr.*, 29, 1903, p. 462.
- NICOLLE (Ch.). *C. R. Acad. Sciences*, 146, 1908, p. 842.
- NOGUCHI et TILDEN. *Journ. experim. Medicine*, 44, 1926, p. 307 et 327.
- NÖLLER. *Ber. klin. Wochenschr.*, 54, 1917, p. 346; *Arch. f. Schiffs. u. Tropenerh.*, 21, 1917, p. 53; Die Züchtung der parasitischen Protozoen in Handbuch der pathogenen Protozoen, Leipzig, Barth Er, 1923.
- NOVY et KNAPP. *Journ. of Hygiene*, 6, 1906, p. 111.
- NOVY et MAC NEAL. *Journ. Amer. med. Assoc.*, 45, 1903; *Journ. infect. Dis.*, 2, 1903, p. 256.
- NOVY, MAC NEAL et TORREY. *Journ. infect. Dis.*, 4, 1907, p. 223.
- OLSEN. *Centralbl. f. Bakt. Origin.*, 85, 1921, p. 12.
- PFEIFFER. *Deutsch. med. Wochenschr.*, 18, 1892, p. 28; *Ztschr. f. Hyg.*, 13, 1893, p. 357.
- PONSELLE. *C. R. Soc. Biol.*, 74, 1913, p. 339 et 522; *Annales de parasitologie humaine et comparée*, 1, 1923, p. 155 et 181.
- PUTNAM et JAY. *Journ. Med. Res.*, 42, 1920-1921, p. 1.
- REITH. *Journ. inf. Dis.*, 32, 1923, p. 243.
- RIVERS. *Journ. Amer. med. Assoc.*, 76, 1921; *Journ. Bact.*, 7, 1922, p. 579; *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, 33, 1922, p. 149 et 429.
- RIVERS et POOLE. *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, 32, 1921, p. 202.
- SALLE. *Journ. of infect. Dis.*, 49, 1931, p. 473 et 481.
- SALLE et SCHMIDT. *Journ. of infect. Dis.*, 43, 1928, p. 378.
- SCHULZ. *Arch. f. Protistenk.*, 49, 1923-1924, p. 216.
- SIMON et REETZ. *Liebigs Annalen*, 485, 1931, p. 73; *Ztschr. f. Anorg. Chem.*, 194, 1931, p. 89.
- THJOTTA. *Journ. exper. Med.*, 33, 1921, p. 763; *Journ. exp. Med.*, 40, 1924, p. 671.
- THJOTTA et AVERY. *Proceed. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 18, 1920-1921, p. 197; *Journ. exper. Med.*, 34, 1921, p. 97 et 455.
- THOMSON (J. G.). *Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 24, 1930, p. 5.
- THOMSON (J. G.) et ROBERTSON. *Trans. of Roy. Soc. of Trop. Med. a. Hyg.*, 25, 1932, p. 287.
- TYZZER et WALKER. *Journ. med. Res.*, 40, 1919, p. 129.



- VOGES. *Ber. klin. Wochenschr.*, 1894.  
WARBURG. *Bioch. Zeitschr.*, **231**, 1931, p. 493.  
WEBSTER et BADISCH. *Journ. exper. Med.*, **42**, 1925, p. 473.  
WENYON. *Arch. f. Protistenk.*, **31**, 1913, p. 1 ; *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. a Hyg.*,  
**15**, 1921, p. 153 ; Protozoology, Baillière, Tindall a. Cox, éditeur,  
London.  
WILLIAMS et COLL. *Journ. infect. Dis.*, **14**, 1914, p. 316.  
WILLIAMS et PORITSKY. *Journ. med. Res.*, **42**, 1920-1921, p. 405.  
WOLFF. *Ces Annales*, **24**, 1910, p. 789.  
YOUNG et VAN SAT. *Journ. exper. Med.*, **37**, 1923, p. 233.  
ZEILE et HELLSTROM. *Zeitschr. f. Physiol. Chemie*, **195**, 1931, p. 39.  
ZOTTA. *Annales scientifiques de l'Université de Jassy*, **12**, 1923, p. 35.
- 

Le Gérant : G. MASSON.